



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**PATRÓN DE EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA
INTEGRINA $\alpha_6\beta_4$ EN CÉLULAS ACINARES DE GLÁNDULAS
SALIVALES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN.**

JOSÉ VELOZO HERMOSILLA

PROFESORES DIRECTORES DE TESIS: PROFESOR PATROCINANTE:

Dra. María Julieta González Burgos
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch
Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Dr. Claudio Molina Castillo
Departamento de Patología Oral
Facultad de Odontología
Universidad Mayor

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

SANTIAGO-CHILE
2006

a todos aquellos que necesitan una respuesta...

AGRADECIMIENTOS

Dra. Maria Julieta González, jefa del proyecto de investigación del cuál forma parte esta tesis, por recibirme en su laboratorio, y sobre todo, por su constante apoyo científico y humano durante todo el tiempo de realización de este trabajo.

Profesora Cecilia Alliende, por su invaluable ayuda en las técnicas histológicas.

Dr. Sergio Aguilera y Dr. Rafael Romo, por su valiosa contribución para obtener las biopsias.

Dr. Claudio Molina, por su constante apoyo con conocimientos clínicos y de análisis estadísticos.

Dra. Lisette Leyton, por proporcionar algunos de los anticuerpos utilizados.

Por supuesto a Paola Pérez, Mónica Brito, Patricia Ewert, Yoon-Joung Kwon, Cecilia Leyton, Isabel Castro, y a todos los integrantes del laboratorio de Biología Celular, por su continua colaboración y camaradería durante el desarrollo de este trabajo.

A Javier, cuya labor fue fundamental para el correcto desempeño del trabajo en el laboratorio, quien además siempre mostró una excelente disposición.

Y finalmente, a todos aquellos que de manera indirecta colaboraron en el desarrollo de esta investigación.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Dres. María Julieta González Burgos y Claudio Molina Castillo. El asesor médico de esta tesis fue el profesor Dr. Sergio Aguilera Covarrubias. Financiada por los proyectos Fondecyt 1020755 y 1050192.

Todos los pacientes participantes en este estudio fueron diagnosticados y clasificados por el Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, médico reumatólogo de la Clínica INDISA-Universidad Andrés Bello, y co-investigador de los proyectos mencionados. Esta institución facilita, sin costo, los pabellones quirúrgicos e insumos para realizar las biopsias de glándulas salivales labiales, que se practican gratuitamente a los pacientes con fines diagnósticos. Además, realiza los exámenes de laboratorio que no pueden ser cancelados por los enfermos.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
TABLA DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades del síndrome de Sjögren.	1
2. Breves antecedentes sobre la matriz extracelular.	1
3. Matriz extracelular y síndrome de Sjögren	3
4. Generalidades de las integrinas	5
5. Integrina $\alpha6\beta4$	7
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Reactivos	13
2. Obtención de la muestra	13
2.1. Selección de pacientes	13
2.2. Obtención de glándulas salivales labiales	14
3. Determinación de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativo	15
3.1 Extracción de RNA total	15
3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído	15
3.3 Síntesis de cDNA	16
3.4 Partidores específicos	16
3.5 PCR	17

3.5.1 Optimización de la reacción de PCR	18
3.5.2 Detección y análisis de los productos de amplificación	18
4. Extracción de proteínas	19
5. Cuantificación de proteínas.	19
6. Análisis de las proteínas por inmunquímica	19
6.1. Preparación de la muestra	20
6.2 Separación electroforética de proteínas	20
6.3 Western blot	20
7. Co-inmunoprecipitación	21
8. Inmunohistoquímica	22
9. Análisis estadísticos	23
RESULTADOS	24
1. Patrón electroforético del RNA total de glándulas salivales labiales humanas.	24
2. Validación de la RT-PCR semicuantitativa	24
3. Niveles relativos de los mRNA de la integrina $\alpha6\beta4$ en glándulas salivales labiales de individuos controles y de pacientes.	27
4. Niveles relativos de las proteínas $\alpha6$ y $\beta4$ en glándulas salivales labiales de individuos controles y de pacientes.	30
4.1 Niveles relativos de proteínas de la integrina $\alpha6$.	30
4.2 Niveles relativos de proteínas de la integrina $\beta4$.	32
4.3 Niveles de proteólisis de la integrina $\beta4$	33
4.4 Determinación de la capacidad de unión entre los productos proteolizados de la integrina $\beta4$ con $\alpha6$ en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren.	36
5. Comparación de los niveles relativos de la integrina $\alpha6$ y de integrina $\beta1$ en pacientes con síndrome de Sjögren.	37

6. Distribución subcelular de la integrina $\beta 4$ en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren.	39
7. Correlación entre niveles relativos de integrina $\alpha 6\beta 4$ y parámetros morfológicos	42
DISCUSIÓN	44
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Pág.
Tabla 1	Datos demográficos de los grupos.	14
Tabla 2	Secuencia de partidores específicos usados para la reacción de PCR.	17
Tabla 3	Condiciones para la reacción de PCR	18
Tabla 4	Condiciones de <i>Western blot</i> para la identificación de integrinas y proteínas normalizadoras	21
Tabla 5	Detalle de anticuerpos primarios y secundarios.	22
Tabla 6	Valores de correlación para controles.	34
Tabla 7	Valores de correlación para pacientes.	34
Figura 1	Modelo de la estructura molecular de la lámina basal.	2
Figura 2A	Esquema de señalización dependiente de anclaje.	4
Figura 2B	Detalle del complejo de unión célula-matriz extracelular.	4
Figura 3	Acino de un sujeto control y de un paciente con síndrome de Sjögren.	5
Figura 4	Sitios putativos de corte en el dominio citoplasmático de $\beta 4$ por calpaína.	11
Figura 5	Detección electroforética de RNA de glándulas salivales labiales.	24
Figura 6	Determinación de las condiciones de la reacción de PCR para la integrina $\alpha 6$.	26

Figura 7	Determinación de las condiciones para la reacción de PCR para la integrina $\beta 4$.	27
Figura 8	Niveles relativos de mRNA de integrina $\alpha 6$ en glándulas salivales labiales de individuos controles y pacientes	28
Figura 9	Niveles relativos de mRNA de integrina $\beta 4$ en glándulas salivales labiales de individuos controles y pacientes	29
Figura 10	Detección y cuantificación proteica de la integrina $\alpha 6$	31
Figura 11	Comparación densitométrica de los niveles relativos de la integrina $\alpha 6$ entre pacientes con bandas de diferente intensidad.	32
Figura 12	Detección y cuantificación proteica de la integrina $\beta 4$.	33
Figura 13	Patrón de señales de integrina $\beta 4$ obtenido mediante <i>western blot</i> .	34
Figura 14	Evaluación de los niveles relativos de proteólisis.	35
Figura 15	Efecto de la concentración de EGTA en la proteólisis de la integrina $\beta 4$.	36
Figura 16	Co-inmunoprecipitación de productos proteolizados de la integrina $\beta 4$.	37
Figura 17	Detección y cuantificación proteica de la integrina $\beta 1$.	38
Figura 18	Niveles relativos de integrina $\alpha 6$ y $\beta 1$ determinada caso a caso.	39
Figura 19	Distribución y colocalización de integrina $\beta 4$ y laminina en secciones de glándulas salivales de individuos controles.	40

Figura 20	Distribución de integrina $\beta 4$ y laminina en un acino sero-mucoso en secciones de glándulas salivales de individuos controles.	40
Figura 21	Distribución y colocalización de integrina $\beta 4$ y laminina en secciones de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.	41
Figura 22	Modelo de formación de hemidesmosoma en células con integrina $\beta 4$ y su dominio citoplasmático truncado.	51
Figura 23	Modelo propuesto del sistema de rescate a anoikis en células acinares de GSLs de pacientes con síndrome de Sjögren.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	: DNA complementario
dNTP	: Desoxinucleótido trifosfato
DEPC	: Dietil-pirocarbonato
EDTA	: Ácido etilen-diamino-tetraacético.
EGF(R)	: (Receptor de) factor de crecimiento epidermal
EGTA	: Ácido etilen-bis(oxietilenonitrilo)-tetraacético.
FNIII	: Fibronectina tipo III
GAPDH	: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GS	: Glándulas salivales
GSL	: Glándulas salivales labiales
HD	: Hemidesmosoma
IL	: Interleuquina
INF- γ	: Interferon gama
LB	: Lámina basal
LM	: Laminina
mAh	: MiliAmperio por hora
MEC	: Matriz extracelular
MMP(s)	: Metaloproteinasa(s) de matriz
MOPS	: Ácido 3-N-morfolino propano
NOD	: Diabético no obeso
pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa, asociada a transcriptasa inversa.
SC	: Segmento conector de las repeticiones tipo fibronectina III
TGF- β	: Factor de crecimiento transformante beta
TIMP(s)	: Inhibidor(es) tisular(es) de metaloproteinasa(s)
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune que causa alteraciones en la estructura y función de las glándulas exocrinas debido a la destrucción de la lámina basal de acinos y ductos, y a la degradación de las principales proteínas de matriz extracelular. El progresivo reemplazo de componentes exocrinos por tejido adiposo y fibroso, conduce a la sequedad de mucosas, principalmente oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmia), que son los principales síntomas de esta enfermedad.

En las glándulas de estos pacientes, también se pueden encontrar focos de infiltrado linfocitario, los que se correlacionan con el progreso de la enfermedad. Sin embargo, cambios importantes en las células epiteliales y la matriz extracelular, darían cuenta del desarrollo de esta enfermedad de manera independiente a la presencia de infiltrado de células mononucleares. A nivel molecular, la degradación de la matriz extracelular es inducida por un desequilibrio entre metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores tisulares, favoreciendo la actividad proteolítica. La degradación de componentes de la lámina basal desorganiza la estructura y conduce a la pérdida de anclaje celular a la matriz extracelular.

La señalización dependiente de anclaje mantiene la polaridad celular principalmente a través de complejos de adhesión llamados hemidesmosomas. El receptor involucrado en formar estas estructuras es la integrina $\alpha6\beta4$, cuyo ligando de mayor afinidad es la laminina-5. Recientemente se ha demostrado que la laminina-5 está sobreexpresada (a nivel de proteínas y mRNA) en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren. Además, análisis de microarreglos de cDNA obtenidos de glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren, y comparados con los obtenidos de individuos control, han demostrado que varias proteínas citoplasmáticas normalmente asociadas a la integrina $\alpha6\beta4$, por ejemplo BP230 y citoqueratina 8/18, están sobreexpresadas.

Las integrinas, además de su papel como mediadores de la interacción célula-matriz, participan en la señalización hacia y desde la célula (señalización bidireccional), la que es importante para regular procesos como proliferación, diferenciación y muerte celular. Por lo tanto, la degradación no regulada de lámina basal, no sólo modifica las propiedades de adhesión de la célula, sino también las señales que estos receptores

llevan al interior de la célula, conduciendo a importantes cambios que pueden llevar a la muerte celular.

De esta manera, se decidió analizar los niveles de expresión y localización subcelular de la integrina $\alpha6\beta4$ en células acinares de pacientes con síndrome de Sjögren e individuos control, y así estudiar si estos se relacionan con los cambios que ocurren en estas glándulas.

Se propuso la siguiente hipótesis:

“En glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren la pérdida de adhesión de células acinares a su lámina basal y la sobreexpresión de laminina-5, se acompañan de una sobreexpresión y/o redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$ ”

Para evaluar esta hipótesis, se determinaron los niveles de mRNA y de proteínas de las subunidades $\alpha6$ y $\beta4$ en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren y se compararon con los resultados obtenidos de individuos controles. Además, mediante inmunohistoquímica, usando anticuerpos específicos para cada subunidad, se analizó la localización de la integrina $\alpha6\beta4$ en la membrana plasmática de células acinares y la de laminina en láminas basales de acinos de glándulas salivales. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los niveles relativos de mRNA entre pacientes y controles, tanto para la integrina $\alpha6$ ($p = 0,49$) como para la integrina $\beta4$ ($p = 0,71$). Al analizar los niveles relativos de proteínas, en el caso de $\alpha6$, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo total de pacientes y el grupo control ($p = 0,2$), sin embargo, al separar el grupo de pacientes en dos subgrupos de acuerdo a su nivel de expresión, se encontró que el que presentaba niveles menores no tenía diferencias significativas respecto al grupo control ($p = 0,296$), mientras que el otro, que presentaba niveles relativos mucho más altos, sí mostró diferencias significativas ($p = 0,014$). En cuanto a la proteína $\beta4$, ésta se encontró de manera intacta (200 kDa) y proteolizada (172 y 145 kDa) tanto en pacientes como en controles. De ambas formas, los niveles fueron significativamente menores en pacientes respecto a controles ($p = 0,02$).

En cuanto a la localización subcelular de la integrina, en pacientes se encontró una importante redistribución hacia la superficie lateral de la célula, encontrándose

incluso a nivel citoplasmático en los casos de mayor desorganización de la lámina basal.

Estos y otros resultados confirman de manera parcial la hipótesis, donde el mecanismo de rescate al desanclaje podría llevarse a cabo a través de la redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$ a nivel subcelular. Existirían otros mecanismos por los cuales se mantendrían activas algunas de las señales dependientes de anclaje, para completar el sistema de rescate a la muerte celular, y que no pasarían necesariamente por una mayor cantidad de integrina $\alpha6\beta4$.

SUMMARY

Expression and distribution pattern of integrin $\alpha6\beta4$ in acini cells from salivary glands from patients with Sjögren's Syndrome

The Sjögren's syndrome is an autoimmune disease that causes alterations in the structure and function of exocrine glands due to the destruction of basal lamina of acini and ducts and degradation of the major structural extracellular matrix proteins. The progressive replacement of exocrine components by fibrous and adipose tissues leads to the main symptoms of this disorder such as oral and ocular dryness.

Focal infiltration of lymphocytes into the glands of these patients has also been observed and it correlates with the progression of the disease. However, the important changes occurring in epithelial cells and the extracellular matrix might account for the development of this disorder, independent of the presence of infiltrating mononuclear cells. At a molecular level, extracellular matrix degradation is triggered by an altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors that favours the proteolytic activity. Degradation of basal lamina components disorganize this structure and lead to the loss of acinar cell anchorage to the extracellular matrix.

Anchorage-dependent cellular signaling maintains cell polarity mainly due to the assembling of adhesion complexes such as hemidesmosomes. Receptor implicated in forming these structures is $\alpha6\beta4$ integrin for which laminin-5 is the ligand of highest affinity. It has been recently shown that laminin-5 is over expressed (at a protein and mRNA level) in labial salivary glands from Sjögren's syndrome patients. Additionally, microarrays analysis that compared acinar cell samples obtained from labial salivary glands of control individuals *versus* Sjögren's syndrome patients indicated that several cytoplasmic proteins (e.g. BP230 and cytokeratins 8/18) normally associated with $\alpha6\beta4$ integrin are over expressed in the glands of the Sjögren's syndrome patients.

Integrins, in addition to their role as mediators of cell matrix-cell interaction participate in outside-in and inside-out signalling, important for other processes like proliferation, differentiation and cell death. Therefore, non-regulated basal lamina degradation modifies not only the adhesive properties of a cell, but also, the signals

these receptors have to convey to the interior of the cell leading to dramatic changes that could go from life to death.

Thus, gene expression, protein levels and localization of the $\alpha6\beta4$ integrin in acinar cells of labial salivary glands from Sjögren's syndrome patients and control individuals were monitored to study whether integrin levels and subcellular distribution are related to changes occurring in these glands.

Therefore, the hypothesis proposed was:

“Lack of adhesion of acinar cell to their basal lamina and the over-expression of laminin-5 in labial salivary glands of Sjögren's syndrome patients are paralleled by increased levels and/or redistribution of the $\alpha6\beta4$ integrin”

To evaluate this hypothesis, mRNA and protein levels of $\alpha6$ and $\beta4$ integrin subunits present in labial salivary glands were measured by PCR and western blot techniques, respectively. Results obtained for labial salivary glands of Sjögren's syndrome patients were compared with those obtained for control individuals. Subcellular localization of $\alpha6\beta4$ was analyzed by immunohistochemistry using specific antibodies against each subunit. Non-significant differences for either $\alpha6$ ($p = 0.49$) or $\beta4$ ($p = 0.71$) integrins in samples obtained from labial salivary glands of patients *versus* control subjects were found when comparing mRNA levels. At a protein level, $\alpha6$ integrin was not significantly different in patients *versus* controls ($p = 0.2$). However, they show two distinct populations that when analyzed separately, one had $\alpha6$ integrin protein levels similar to those of controls ($p = 0.296$) while the second group, presenting much higher levels of protein, was significantly different than samples from control individuals ($p = 0.014$). On the other hand, $\beta4$ integrin was found intact (200 kDa) or proteolyzed by calpain (172 and 145 kDa) in both Sjögren's syndrome patients as well as in control subjects. In any case, protein levels were significantly lower in Sjögren's syndrome patients than in controls ($p = 0.02$).

In terms of $\alpha6\beta4$ integrin localization, an important redistribution toward the basolateral surface of the cell was observed and in cases where the basal lamina was more disorganized, $\alpha6\beta4$ was even found in the cytoplasm.

These and other results, partially confirm the hypothesis. The rescue mechanism to cell detachment, could be carried out by integrin $\alpha6\beta4$ redistribution.

Other mechanisms would keep activated some attachment-dependent signals to complete this rescue system, and these would not imply necessarily a higher amount of integrin $\alpha6\beta4$.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica, autoinmune, que puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más frecuente entre los 40 y 60 años, llegando a constituir una prevalencia del 2% en la población adulta [2]. Afecta principalmente a mujeres en una relación de 9:1 respecto a hombres. Se caracteriza por la sequedad de mucosas, principalmente oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmia), debido a la disminución o ausencia de secreciones, causada por alteración en la estructura, organización y función del parénquima y de la matriz extracelular de las glándulas que las producen. Estos cambios se acompañan de una infiltración de células mononucleares, pudiendo terminar en una atrofia glandular, debido a la reducción o destrucción de acinos [2, 24]. También pueden presentarse manifestaciones extraglandulares tales como artritis, fibrosis pulmonar, nefritis intersticial, neuropatías periféricas y/o compromiso del sistema nervioso central, hepatitis o cirrosis biliar, vasculitis, etc. Un 5% de los pacientes pueden presentar durante la evolución de la enfermedad un linfoma de tipo B [2, 4]. El SS puede presentarse aislado (SS primario), o bien se puede observar asociado a otra enfermedad autoinmune (SS secundario), con mayor frecuencia artritis reumatoidea [59].

Se han realizado muchos estudios para analizar el papel del infiltrado linfocitario en la destrucción del parénquima glandular. De esta manera, se ha determinado la importancia que tiene el proceso de apoptosis provocado por los linfocitos T CD4⁺, el cual a través de los mecanismos Fas/FasL y granzima-perforina, tendría una participación relevante [42]. Estudios más recientes han encontrado cambios importantes en la organización de las células epiteliales y matriz extracelular de las glándulas salivales de estos pacientes. Estos resultados podrían explicar el daño glandular [28, 44].

2. Breves antecedentes sobre la Matriz Extracelular

El tejido conectivo que rodea a las células del parénquima glandular se compone de células estromales inmersas en una intrincada matriz, conocida como la

matriz extracelular (MEC), que mantiene la arquitectura y función de acinos y de conductos. La MEC contiene fibras proteicas estructurales (colágeno y elastinas) y adhesivas (fibronectina y laminina) entrelazadas en un gel hidratado compuesto de una red de cadenas de glicosaminoglicanos [1]. Los componentes de la MEC están sometidos a un constante recambio, que incluye síntesis y degradación. La regulación de este proceso depende de una variedad de proteasas, tales como las metaloproteinasas de MEC (MMPs) y sus respectivos inhibidores tisulares (TIMPs). En condiciones normales, ambas familias de proteínas deben expresarse en un equilibrio que permita un recambio fisiológico de la MEC [44].

Rodeando a los acinos y conductos, hay una fina capa de MEC denominada lámina basal (LB), cuya organización, como se ve en la Figura 1, está dada por dos redes poliméricas, una de colágeno IV y la otra de laminina, que se interconectan por nidógeno (o entactina) y proteoglicanos tipo perlecán. Las células del epitelio acinar se encuentran unidas a proteínas de la LB mediante moléculas de adhesión llamadas integrinas que se relacionan a nivel intracelular con elementos del citoesqueleto, como actina y citoqueratina [5].

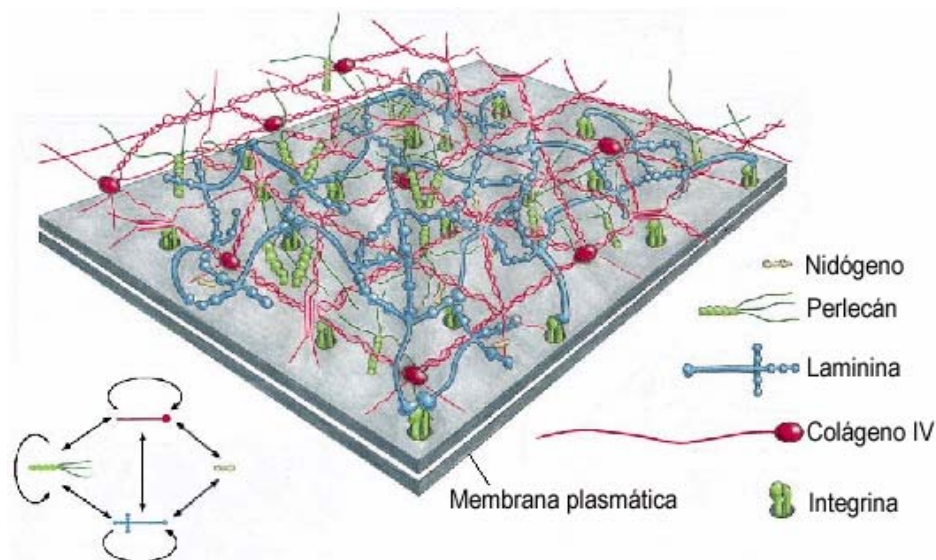


Figura 1. Modelo de la estructura molecular de la lámina basal.
Adaptado de Alberts, B. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4ª Ed.

3. Matriz Extracelular y Síndrome de Sjögren

Como se mencionó, las glándulas salivales (GS) y lagrimales de pacientes con SS, presentan alteraciones en la estructura, organización y función del parénquima y de la MEC, que pueden culminar en una atrofia glandular debido a la reducción del componente acinar, ya sea por pérdida y/o disminución del volumen de células acinares, o bien por pérdida total del acino, el cual va siendo reemplazado por tejido fibroso y adiposo, con los consecuentes síntomas de sequedad ocular y oral [14, 44].

En pacientes con SS se ha encontrado un aumento en la degradación de proteínas de la LB (laminina y colágeno IV) y estroma (colágenos I, III, y fibronectina) como consecuencia de un desequilibrio en la expresión de MMPs/TIMPs. Aquí se encontró que las MMP-3 y -9, sintetizadas por las propias células acinares, aumentaron su expresión, y MMP-9 además aumentó su actividad. Los niveles de TIMP-1 fueron más bajos en pacientes con SS que en controles, favoreciendo la degradación. Los niveles de expresión de MMP-3 y MMP-9 se correlacionaron con el nivel de severidad de esta patología [24, 43, 44].

En líneas celulares derivadas de glándulas salivales, la expresión de MMPs es modulada por una variedad de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas [4]. Las citoquinas IL-1 α , IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el interferón γ (IFN- γ) son potentes inductores de algunas MMPs [4, 14, 15, 62]. Al respecto, estudios realizados en GS de pacientes con SS, han revelado que las citoquinas no sólo son producidas por células del infiltrado mononuclear, sino también por células de ductos y acinos. Se encontró que estas últimas células, tanto en individuos sanos como en pacientes con SS, expresan y sintetizan citoquinas del tipo IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β e IFN- γ , sin embargo, existe una diferencia en los niveles en que estas moléculas se sintetizan [14, 27, 55]. Algunas de estas citoquinas, a través de procesos autocrinos y/o paracrinos podrían provocar un aumento en los niveles de expresión de algunas MMPs en el parénquima glandular.

Como ya se mencionó, la interacción entre la célula epitelial y la MEC está mediada por receptores de adhesión, entre ellos las integrinas, que además de cumplir funciones de anclaje de la célula epitelial a la LB, como se representa en la Figura 2, participan en los procesos de señalización celular [19, 20]. De esta manera, cuando la LB se degrada significativamente, la célula pierde su anclaje, y la pérdida de los

estímulos dependientes de anclaje puede modificar su patrón de diferenciación y proliferación celular, o llevar a la muerte celular por anoikis, que es la apoptosis inducida por la pérdida de contactos célula-matriz mediados por integrinas [16].

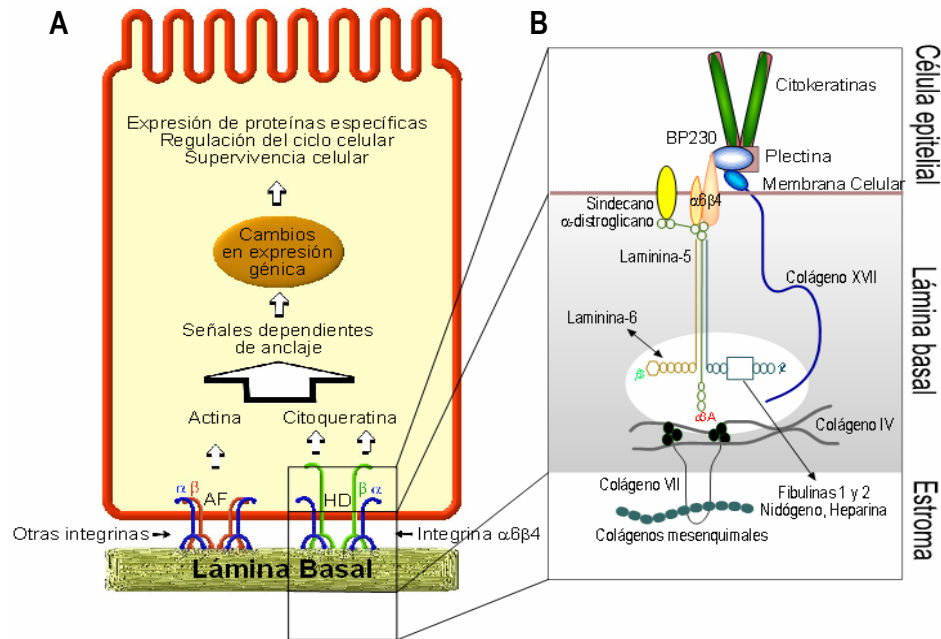


Figura 2. (A) Esquema de señalización dependiente de anclaje (AF: Adhesiones focales, HD: Hemidesmosomas).
(B) Detalle del complejo de unión Célula-Matriz Extracelular.
 Imagen (B) adaptada de Aumailley y cols. 2003 [3].

En las GS de los pacientes con SS, la desorganización de la LB, por acción de MMPs, provoca pérdida de polaridad de la célula acinar (Figura 3), inducción de proliferación celular y cambios en los patrones de diferenciación. En casos extremos hay pérdida de adhesión y muerte celular por anoikis [24, 43, 45].

Bajo este escenario, se evaluó el recambio de proteínas de la LB a fin de comprender la desorganización que presentan las LBs de acinos y conductos de las glándulas de los pacientes SS. Se encontró una sobreexpresión de laminina-5 (mRNA y proteína) y una marcada degradación de nidógeno, proteína que interconecta colágeno IV con laminina [32]. Por otro lado, en acinos provenientes de glándulas de pacientes SS, se midió la expresión génica de un conjunto de genes empleando microarreglos de cDNA. Este estudio mostró cambios significativos de la expresión de genes que codifican para proteínas que se asocian a la integrina $\alpha\beta\delta$, tales como

BP230 y la dupla de citoqueratinas 8/18. Además, estos resultados confirmaron la sobreexpresión de laminina-5 (LM5) determinada previamente por RT-PCR y *Western blot* [45].

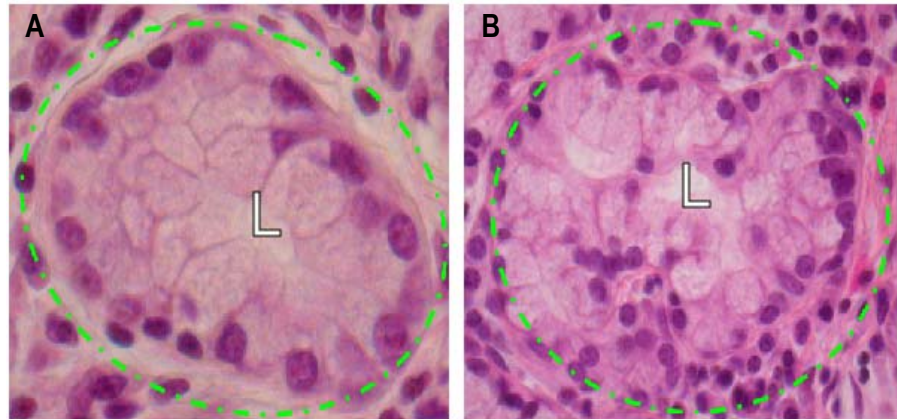


Figura 3. (A) Acino de un sujeto control, con células polarizadas. **(B)** Acino de un paciente SS, notablemente desorganizado, donde se observa la pérdida de polaridad nuclear. (L: Lumen, Línea Segmentada: Contorno del acino). Imagen tomada de Pérez y cols. 2005 [43].

LM5 es el ligando específico de la integrina $\alpha6\beta4$ y la interacción de ambas desencadena una serie de eventos que se traducen en el ensamblaje de complejos de adhesión llamados hemidesmosomas. Estos complejos anclan la célula a la LB, y a través de mecanismos de señalización se regularía la organización estructural y funcional del epitelio glandular [54].

Considerando estos antecedentes, esta tesis se enfocará al estudio de la expresión génica, los niveles de proteína y la distribución celular de la integrina $\alpha6\beta4$. Se intentará comprender cómo se relacionan la expresión (mRNA y proteína) y la distribución de la integrina $\alpha6\beta4$ con los cambios observados en la LB y en la célula acinar de las GS de pacientes SS.

4. Generalidades de las Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas de transmembrana que median interacciones célula-célula y célula-MEC en organismos multicelulares. Están involucradas en procesos tales como embriogénesis, respuesta inmune, inflamación, mantención de la integridad de los tejidos y otros [22].

Las integrinas cumplen su función como heterodímeros tipo $\alpha\beta$, unidos de manera no covalente. Aparte de anclar células a la MEC, las integrinas a través de su dominio citoplasmático, pueden participar tanto en vías de transducción de señales, interactuando con el citoesqueleto y modulando su ensamblaje, como también regulando la forma celular y la migración [21]. Actualmente se han caracterizado 18 cadenas α y 8 cadenas β en vertebrados, las cuales además presentan isoformas generadas por procesamiento alternativo de su mRNA [5].

La unión de las integrinas a sus ligandos es dependiente de cationes divalentes (Ca^{+2} ó Mg^{+2} dependiendo de la integrina). Para ello, la cadena α presenta tres o cuatro dominios de unión a estos cationes en su extremo extracelular. El tipo de catión puede influir tanto en la afinidad, como en la especificidad de la unión de la integrina a su ligando. Los dominios N-terminales de las cadenas α y β se asocian para formar la región extracelular de la integrina, que contiene el sitio de unión al ligando [21].

A pesar del alto número de heterodímeros $\alpha\beta$ distintos que potencialmente podrían formarse, las células mantienen un repertorio limitado. Sólo se conocen poco más de veinte heterodímeros [22].

La cadena $\beta1$, que forma dímeros con varias cadenas α , se encuentra en casi todas las células de vertebrados. La integrina $\alpha5\beta1$, por ejemplo, es un receptor de fibronectina. La $\alpha6\beta1$ es un receptor de laminina en varios tipos celulares. La cadena $\beta2$, por el contrario, sólo se expresa en la superficie de leucocitos y forma dímeros con un número menor de cadenas α . Las integrinas mencionadas median principalmente interacciones de tipo célula-célula más que célula-MEC, uniendo ligandos ubicados en otras células, por ejemplo moléculas de adhesión como ICAM. La cadena $\beta3$ forma dímeros con αV y se localizan en una variedad de tipos celulares, uniéndose a varias proteínas de MEC, por ejemplo fibrinógeno, vitronectina, etc. La cadena $\beta4$ sólo se asocia con la cadena $\alpha6$ y se expresa sólo en células epiteliales, actuando como receptor de laminina [33]. La cadena $\beta4$ presenta algunas diferencias respecto a las demás cadenas β . Estas diferencias serán vistas más adelante.

La especificidad de unión del dominio extracelular al ligando, está determinada por la conformación adoptada, de manera individual, de las cadenas α y β que componen el heterodímero. Sin embargo, el microambiente celular también está

involucrado en modular la actividad de unión, y es regulada mediante señales bidireccionales [20]. Por ejemplo, un mismo cDNA transfectado en dos líneas celulares distintas, puede dar como resultado, distintas actividades de unión de la integrina [5].

Por el dominio intracelular, las integrinas se asocian con componentes del citoesqueleto a través de la cadena β . La mayoría de las integrinas se asocian con actina, excepto la $\alpha6\beta4$ que se une a filamentos intermedios de citoqueratinas. Esta unión al citoesqueleto, en el caso de las integrinas que se unen a actina, es a través de proteínas adaptadoras como vinculina y talina. En el caso de $\alpha6\beta4$, son las proteínas BP180, BP230 y plectina las que unen la integrina a la citoqueratina. BP230 y plectina son proteínas citoplasmáticas del tipo plaquina, cuyo extremo carboxilo tiene dominios de unión a filamentos intermedios. Estas proteínas intermediarias además median la señalización desde la integrina hacia el interior de la célula [20].

Cuando las integrinas se unen al ligando por el dominio extracelular, cambian su conformación y pasan de un estado de baja afinidad, a otro activo de alta afinidad. En este estado activo, se unen al citoesqueleto y desencadenan una señal que induce la reorganización del citoesqueleto y la agrupación de integrinas en el sitio de unión. Se forman así agregados que aumentan la avidéz por la unión [21, 57], es decir, se acrecienta la unión a la MEC y la organización del citoesqueleto, en un sistema de retroalimentación positiva [20].

Después de que las integrinas se unen a sus ligandos extracelulares, lo hacen con el citoesqueleto, a través de proteínas intermediarias. Así, se forma un complejo de señalización, de donde se generan señales que regulan la organización del citoesqueleto, a través de la actividad de proteínas quinasas, receptores de factores de crecimiento y canales iónicos.

5. Integrina $\alpha6\beta4$

Subunidad $\alpha6$. La integrina $\alpha6$ presenta dos isoformas, la $\alpha6A$ y $\alpha6B$, cuyos mRNA son generados por procesamiento alternativo. Estos mRNA originan precursores peptídicos de ~150 kDa cada uno, que luego, mediante una modificación post-traduccional, generarán una cadena pesada de 120 kDa unida por un puente disulfuro a una cadena liviana de 31 ó 30 kDa [12, 56]. Se ha demostrado que este corte proteolítico, producido probablemente por furina, una serina proteasa, es esencial

para la transducción correcta de señales bidireccionales, pero no para la unión al ligando [12].

La cadena pesada de $\alpha 6$ contiene 875 aminoácidos y se ubica en la región extracelular. La cadena liviana contiene 170 aminoácidos y comprende una región extracelular, el dominio transmembrana y el citoplasmático [11]. Este último puede tener 36 aminoácidos si es la isoforma $\alpha 6A$ ó 54 si es la isoforma $\alpha 6B$ [25].

Las isoformas $\alpha 6A$ y $\alpha 6B$ presentan distintos patrones de distribución en los tejidos humanos. Mientras que la mayoría de los tejidos expresan sólo una de ellas, la mayoría de los epitelios, incluyendo el de las glándulas salivales (acinos y conductos), expresan las dos isoformas [5, 25]. Cuando cualquiera de estas dos isoformas se une con $\beta 4$ no hay diferencias de especificidad hacia el ligando [40].

Subunidad $\beta 4$. La integrina $\beta 4$ es una proteína de ~205 kDa. Tiene un dominio extracelular de 710 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio citoplasmático, excepcionalmente largo, de 1089 aminoácidos [56] que difiere bastante de las otras integrinas β , las que tienen un dominio citoplasmático de alrededor de 50 aminoácidos. En su dominio citoplasmático tiene dos pares de repeticiones tipo fibronectina III (FNIII), ambos separadas por un segmento conector [30].

Se ha demostrado procesamiento alternativo del mRNA de $\beta 4$. Según el tejido, se pueden encontrar hasta cuatro isoformas: la predominante $\beta 4A$, y tres isoformas de menor presencia, la $\beta 4B$, $\beta 4C$ y $\beta 4D$ producidas por el procesamiento alternativo, cuyos pesos moleculares van desde los 195 a 201kDa. Sin embargo, no se han encontrado diferencias funcionales entre estas isoformas [5]. Se ha encontrado una quinta isoforma, la $\beta 4E$, de tan sólo 107 kDa, que carece de las cuatro repeticiones de FNIII y del segmento conector. Esta isoforma se encuentra en niveles muy bajos, a veces difícilmente detectables [58].

Heterodímero $\alpha 6\beta 4$. La integrina $\alpha 6$, para formar un heterodímero, se puede unir tanto a $\beta 1$ como a $\beta 4$. Mientras que todas las células adherentes de vertebrados expresan $\beta 1$, la expresión de $\beta 4$ está restringida a células de origen ectodermal. En células donde se expresa tanto $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 4$, el heterodímero predominante es $\alpha 6\beta 4$ [5, 13, 38, 39, 50, 54].

En cuanto a la localización subcelular de esta integrina, si bien hay excepciones en las que se observa localizada de manera basolateral [39], en general la distribución de $\alpha 6\beta 4$ es altamente polarizada concentrándose en la membrana plasmática basal de la célula epitelial [5]. Esto concuerda con el hecho de que su ligando específico es laminina [33]. Se puede unir a lamininas del tipo 1, 2, 4, y 5 [38, 40], no obstante, es sólo la unión a LM5, su ligando de mayor afinidad en condiciones normales, la que permite la formación del hemidesmosoma [10, 20].

Los hemidesmosomas son estructuras presentes en la mayoría de los epitelios y que conectan la célula con la LB. Juegan un papel importante en el establecimiento y mantención de la adhesión célula-LB, pero además están implicados en la señalización entre la MEC y la célula (Figura 2). La conexión entre la célula y la MEC se lleva a cabo por la interacción citoesqueleto-integrina-LB [50]. Es acá donde toma importancia el dominio citoplasmático de $\beta 4$, el cual, por su excepcional longitud podría exhibir una interacción singular con el citoesqueleto. Se ha visto que cuando la integrina $\beta 4$ tiene completamente truncado su dominio citoplasmático, puede unirse a LM5, pero no podrá formar hemidesmosomas. Esto trae como consecuencia, la disociación de la célula epitelial con la LB [53].

Se han descrito dos tipos de hemidesmosomas, los del tipo I, que implica la interacción de $\alpha 6\beta 4$ – plectina – BP180 – BP230, y los del tipo II, que sólo incluye a $\alpha 6\beta 4$ y plectina [30]. Ambos pueden unirse a filamentos intermedios a través de las proteínas tipo plaquina (plectina y BP230) [30, 51].

Cuando la integrina $\alpha 6\beta 4$ se une a LM5, se activa una tirosina quinasa asociada a integrina, que fosforila $\beta 4$ en las tirosinas 1440 y 1526 ubicadas río arriba del dominio conector, en el dominio citoplasmático [10]. Este evento es seguido por un reclutamiento de las moléculas adaptadoras Shc y Grb2, las que luego enlazan a la integrina con las vías de señalización de Ras [19]. Después de esta interacción, la integrina se incorpora al sitio del hemidesmosoma y se une a plectina. Esta unión haría cambiar la conformación del dominio citoplasmático de $\beta 4$, favoreciendo su unión a BP180. Así se forma un complejo terciario que sirve de plataforma para la unión de BP230, formado un complejo cuaternario que se une a citoqueratina. La interacción de

estos cuatro elementos con los filamentos de citoqueratina organiza el hemidesmosoma tipo I [6, 26, 30, 51].

Se ha encontrado que el dominio río arriba del segmento conector, es decir, dominios FNIII –III y –IV, incluyendo el segmento conector, no son fundamentales para la formación del hemidesmosoma. En mutantes en que se ha delecionado este segmento, $\beta 4$ conserva la función de adhesión epidérmica manteniéndose la estructura de hemidesmosoma. Este dominio activa las vías necesarias para la proliferación y resistencia a apoptosis inducida por estrés [41].

El desensamblaje de los hemidesmosomas también ha sido relacionado con la fosforilaciones de $\beta 4$, y estas son dependientes del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Cuando hay estimulación por EGF, hay fosforilación de $\beta 4$ en los residuos de serina 1356, 1360, y 1364 [37] ubicados en el segmento conector, algunas de las cuales son producidas por PKC- α [49]. Este evento no es seguido por el reclutamiento de Shc o por el aumento en el ensamblaje de hemidesmosomas. Al contrario, este estímulo induce el desensamblaje del hemidesmosoma [34], y al mismo tiempo induce la activación de señales que inducen proliferación y migración [41]. $\alpha 6\beta 4$ estaría asociada a dos quinasas, una activada por EGF y otra por la unión a la MEC [35]. Se encontró que EGFR activa a $\beta 4$ vía Fyn, una proteína quinasa de la familia Src. Esta enzima fosforila el dominio citoplasmático de $\beta 4$ y provoca el desensamblaje del hemidesmosoma [37]. Este desensamblaje ocurre en condiciones fisiológicas, pero también cuando la célula está sometida a estrés, como ocurriría en las células acinares de las GS de los pacientes SS.

Otro hecho de interés es que los dominios citoplasmáticos de $\beta 4$ son regulados por proteólisis. Se ha demostrado que el dominio citoplasmático de $\beta 4$ puede ser procesado por calpaína (isoformas I y II) en dos sitios de corte, generando péptidos de ~165 ó ~130 kDa [18, 46] (Figura 4). Este procesamiento se ha relacionado con un alto remodelamiento del citoesqueleto. Por ejemplo, en células epiteliales de piel, se presenta una gran cantidad de moléculas de $\beta 4$ procesadas, mientras que en células de córnea el procesamiento de $\beta 4$ es restringido. Este procesamiento facilitaría un recambio dinámico de conexiones celulares dependientes de $\beta 4$ [18]. En líneas de células tumorales se ha encontrado proteólisis en la región extracelular de $\beta 4$, por la

acción de MMP-7. De esta manera, se produce un fragmento de ~90 kDa. Este evento se asociaría con la invasividad de las células tumorales [60].

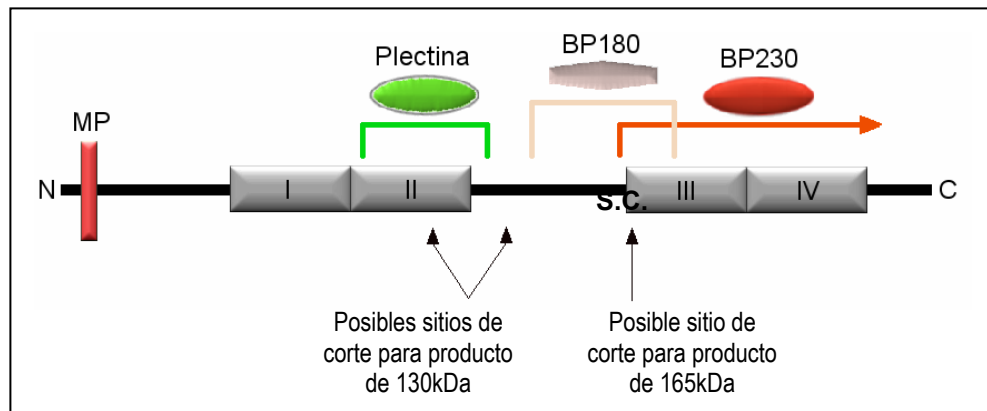


Figura 4. Sitios putativos de corte en el dominio citoplasmático de $\beta 4$ por calpaína (S.C.: Segmento Conector)

Células tumorales de glándula mamaria cultivadas en sistema 3D, presentan una sobreexpresión de la integrina $\alpha 6\beta 4$ acompañada de una secreción autocrina aumentada de LM5. Se demostró que al establecerse la unión entre esta integrina y la LM5, se activó la cascada de señales dependientes de anclaje induciendo la activación de las Rho GTPasa y Rac1. Esta enzima activa $\text{NF}\kappa\text{B}$, que en este sistema actúa como un factor antiapoptótico [63]. De esta manera, estas células sobreviven en condiciones donde LM5 mantendría activo al sistema de señales antiapoptóticas a través de $\alpha 6\beta 4$. Si extrapolamos estos resultados a la sobreexpresión de LM5 encontrada en las glándulas salivales de los pacientes SS, podríamos especular que ésta se produciría como un mecanismo de rescate a la muerte por anoikis de las células acinares. De ser así, se esperaría que ocurriera una sobreexpresión de $\alpha 6\beta 4$ y/o una redistribución de la integrina que permitirían aumentar los sitios de anclajes de las células acinares a su LB.

En esta tesis se verificó la siguiente **Hipótesis**:

“En glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren, la pérdida de adhesión de células acinares a su lámina basal y la sobreexpresión de laminina-5 se acompañan de una sobreexpresión y/o una redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$ ”

En consecuencia, los cambios en el comportamiento de la integrina $\alpha6\beta4$ podrían corresponder a un mecanismo de rescate a la muerte de las células acinares por anoikis.

Objetivo General

Estudiar los niveles de mRNA y proteínas de las subunidades de la integrina $\alpha6\beta4$ y su distribución en la superficie de células acinares de glándulas salivales de pacientes con SS.

Objetivos específicos

Para verificar la hipótesis se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar los niveles de mRNA y de proteínas de las integrinas $\alpha6$ y $\beta4$ en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren y compararlos con los resultados obtenidos de individuos controles.
2. Analizar la localización de la integrina $\alpha6\beta4$ y laminina en la membrana plasmática de células acinares de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Producto	Información adicional y procedencia
Anticuerpo anti- α 6	: Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anticuerpo anti- β 4	: Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anticuerpo anti- α V	: BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU)
Anticuerpo anti- β 1	: Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anticuerpo anti- β -actina	: MP Biomedicals (Irving, CA, EEUU)
Anticuerpo anti-conejo	: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, EEUU)
Anticuerpo anti-ratón	: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, EEUU)
Desoxinucleotidos	: Promega (Madison, WI, EEUU)
Kit de extracción de RNA RNeasy	: Qiagen (Stanford, CA, EEUU)
Membrana de Nitrocelulosa	: BioRad, tamaño de poro 0,45 μ m (Kobe, Japón)
Proteína A-sefarosa	: Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU)
Reactivo de Bradford	: Biorad (Hercules, CA, EEUU)
Reactivo de Electroquimioluminiscencia	: Supersignal West Pico, Pierce (Rockford, IL, EEUU)
RNasaOut	: Invitrogen (Brasil)
SuperScript II	: Invitrogen (Brasil)
Taq-DNA polimerasa	: BioTools (España)

2. Obtención de la muestra

Para hacer los análisis, se trabajó con glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren de individuos controles.

2.1 Selección de pacientes

Se seleccionaron 12 pacientes con síndrome de Sjögren primario, diagnosticados de acuerdo al criterio de consenso Americano/Europeo del año 2002 [59]. Este criterio considera seis categorías: I. Síntomas oculares, que son la manifestación subjetiva de la sequedad ocular. II. Síntomas orales, que corresponden a

la sensación de sequedad bucal. III. Signos oculares, que son la evidencia objetiva de compromiso ocular. IV. Compromiso de glándulas salivales, que es la evidencia objetiva de compromiso salival. V. Características histopatológicas, que determinan el número de focos de infiltrado linfocitario en glándulas salivales menores ($\geq 1/4\text{mm}^2$ de tejido glandular). VI. Detección de autoanticuerpos, que determina la presencia de anticuerpos anti Ro/SSA y/o anti La/SSB.

El diagnóstico definitivo de SS se establece cuando hay hallazgo positivo de 4 de los 6 parámetros anteriores, siempre y cuando la biopsia (V) o la serología (VI) sean positivas. También puede establecerse el diagnóstico cuando existen 3 de 4 de los parámetros objetivos de compromiso glandular (III, IV, V, y VI).

El grupo control estuvo formado por 8 individuos, cuyas biopsias estaban dentro de límites histológicos normales, infiltrado linfocitario ausente o leve y con parénquima glandular bien conservado y sin signos clínicos de SS. Los datos demográficos de pacientes y de individuos controles están incluidos en la Tabla 1.

Las biopsias se obtuvieron luego del consentimiento informado de los pacientes, y la metodología empleada en este trabajo está aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 1. Datos demográficos de los grupos

Grupos	n (género)	Edad promedio (rango) en años
Controles	8 (7M, 1H)	54,3 ± 12,4 (30 – 70)
Pacientes	12 (11M, 1H)	49,3 ± 12,9 (38 – 68)

M = Mujeres, H = Hombres, n=número de individuos

2.2 Obtención de glándulas salivales labiales (GSLs)

Las GSLs se obtuvieron removiéndolas bajo el efecto de anestesia local, realizando una incisión de 1,5 a 2 cm de longitud en la cara interna del labio inferior, paralela al borde bermellón y lateral a la línea media. La incisión fue suturada con seda 3-0 y removida al cabo de 7-10 días. Las glándulas se congelaron inmediatamente en

nitrógeno líquido y luego fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA total o proteínas.

3. Determinación de la expresión génica por RT-PCR semicuantitativo

Para determinar y comparar los niveles de expresión de los genes en estudio, se empleó la técnica de RT-PCR semicuantitativo. El cDNA se obtuvo por transcripción reversa de una muestra de RNA total y luego se amplificó por PCR.

3.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó empleando el método de extracción por afinidad en columnas de silica-gel RNeasy, de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante.

La concentración y pureza del RNA se estableció determinando las absorbancias a 260 y 280 nm, utilizando una dilución 1:200, en un espectrofotómetro de doble haz y calculando la relación 260/280. Sólo se emplearon muestras de RNA total que presentaron una relación de absorbancia 260/280 de 1,8 a 2,0. La concentración del RNA se determinó usando la absorbancia a 260 nm aplicando la regla de conversión convencional [36], donde:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/mL} = 200 \times (\text{Absorbancia } 260 \text{ nm}) \times 40$$

3.2 Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído

Esta técnica se realizó con el propósito de verificar la calidad del RNA extraído y descartar aquellas preparaciones que presentaran degradación y contaminación con DNA genómico.

El gel se preparó a partir de una solución que contenía agarosa 1% (p/v) y formaldehído 8% (v/v) en tampón MOPS (MOPS 0,2 M; acetato de sodio 0,05 M; EDTA 1 mM; pH 8,0). Las muestras se prepararon con 1 µg de RNA total y el volumen necesario de tampón de carga para RNA 6X (azul de bromofenol 0,04% p/v; xileno cianol 0,04% p/v; formaldehído 6% v/v; formamida 40% v/v; glicerol 3% v/v; bromuro de etidio 0,1%; en tampón MOPS; pH 8,0) necesario para completar 8 µL. Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 72°C en baño termostático y se enfriaron rápidamente introduciéndolas en hielo. Luego se procedió a hacer la separación

electroforética a 75 V durante 45 minutos, con tampón MOPS 1X como tampón de corrida.

Todas las soluciones y materiales utilizados fueron tratados con dietil-pirocarbonato (DEPC) para inactivar las ribonucleasas. Los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador UV-B.

3.3 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de las muestras de RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II. La mezcla de reacción se preparó con 1 μ L de RNasaOut (40 U/ μ L), 0,5 μ L de partidores oligo (dT), 0,5 μ L de partidores al azar, 1 μ g de RNA total y agua destilada hasta completar un volumen final de 12 μ L. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 10 minutos y luego fue enfriada rápidamente en hielo. Seguidamente se agregó 4 μ L de tampón 5X (Tris-HCl 250 mM; pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM); 2 μ L de DTT (0,1 M) y 1 μ L de dNTP (0,01 M); se mezcló muy suavemente y se llevó a 42°C por 2 minutos. Se agregó 1 μ L de enzima SuperScript II (200 U/ μ L), mezclando muy suavemente por pipeteo y se incubó a 42°C durante 60 minutos. Luego la reacción se inactivó calentando a 70°C durante 15 minutos.

Del producto de esta reacción de transcripción, se utilizó 1 μ L para estandarizar las condiciones de los PCR.

3.4 Partidores específicos

Para las reacciones de PCR, se utilizaron los partidores específicos para α 6 y β 4 descritos anteriormente en la literatura [8]. Sus secuencias, más las de los partidores de GAPDH diseñados en el laboratorio, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de partidores específicos usados para la reacción de PCR

Gen		Secuencia del partidor	Tamaño del Amplicón
Integrina α_6	Sentido	5'- CTA ACG GAG TCT CAC AAC TC -3'	817 y 701 pb
	Antisentido	5'- ACT CTG AAA TCA GTC CTC AG -3'	
Integrina β_4	Sentido	5'- CGG ATG CTG CTT ATT GAG AAC -3'	413 pb
	Antisentido	5'- GAG GGT GGA GGA TGT GCT TAG -3'	
GAPDH	Sentido	5'- ACT ACA CGA ACA ACA GCC -3'	600 pb
	Antisentido	5'- TCT TGT TGT CTC CTC GTC -3'	

3.5 PCR

La reacción de PCR se realizó con 0,05 U/mL de Taq-DNA polimerasa, 0,2 mM de dNTP, $MgCl_2$ 2 mM, 1 μ L de templado, 2,5 μ L de tampón de reacción 10X (Tris-HCl 75 mM; pH 9; KCl 50 mM; $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM)) y agua para PCR libre de DNAsas/RNAsas, en cantidad necesaria para completar un volumen final de 25 μ L. Para ambos mRNA en estudio, tal como aparece descrito en la literatura [8], se emplearon ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 90 segundos de apareamiento a 60°C, 90 segundos a 72°C para la reacción de polimerización y para la extensión final 5 minutos a 72°C. Se optimizó la concentración de los partidores y el número de ciclos para cada par de partidores a utilizar. Para GAPDH se utilizó el protocolo descrito anteriormente en este laboratorio, que consiste en 25 ciclos de 90 segundos de desnaturalización a 94°C, 120 segundos de apareamiento a 50°C, 180 segundos de polimerización a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se realizaron controles negativos para verificar probable contaminación de los reactivos, donde se incubaron todos los componentes excepto el cDNA, que fue reemplazado por 1 μ L de agua libre de DNAsas/RNAsas. También se controló la contaminación con DNA genómico realizando PCR del RNA total.

3.5.1 Optimización de la reacción de PCR

Se estandarizaron las condiciones de reacción para que la amplificación fuera proporcional a la cantidad de mRNA específico presente en cada muestra. Para lograr este propósito, primero se determinó el punto de inflexión en la curva de amplificación (número de ciclos *versus* cantidad de producto formado). Considerando este número de ciclos, se realizó una curva de saturación por sustrato con distintas diluciones de cDNA, y en ella se eligieron tres diluciones que estuvieran dentro del rango lineal de esta curva.

El cDNA se preparó a partir de 1 μg de RNA total y se diluyó desde 1:1 hasta 1:1000. Así una dilución 1:10 cDNA corresponde a la cantidad cDNA que se obtiene de 100 ng de RNA total.

Los resultados de la determinación de las condiciones para las reacciones de PCR para integrina $\alpha 6$ y $\beta 4$ se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la reacción de PCR

Gen	Concentración partidor ($\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	Nº Ciclos	RNA (ng)
$\alpha 6$	10	30	100, 300 y 500
$\beta 4$	10	28	100, 300 y 500
GADPH	10	25	100, 300 y 500

Condiciones para la reacción de PCR determinadas experimentalmente.

3.5.2 Detección y análisis de los productos de amplificación

Se prepararon geles de agarosa al 1,5% en presencia 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de bromuro de etidio en tampón TAE (Tris-HCl 0,04 M; ácido acético 0,04 M; EDTA 2 mM; pH 8,0). Se cargaron alícuotas de 5 μL de cada una de las reacciones de PCR preparadas con las diluciones determinadas a partir de la curva de saturación por sustrato. También se cargó el amplificado del gen de GAPDH como control. Todos los geles se hicieron en duplicados. Luego, los geles fueron fotografiados sobre un transiluminador UV-B, y la cantidad de producto formado se midió por intensidad de fluorescencia emitida, que fue determinada densitométricamente. Para cada gen en estudio, los valores de intensidad

de fluorescencia se normalizaron respecto a la intensidad de fluorescencia emitida por GAPDH.

4. Extracción de proteínas

Las GSLs se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA (Tris-HCl 50 mM; Tritón X-100 1%; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; EGTA 10 mM y desoxilato de sodio 8%; pH 7,4), en una relación 1:5 (p/v) a 4°C, en un mortero con N₂ líquido. Este homogeneizado se sometió a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento durante 5 minutos en cada estado. Luego se continuó la homogeneización en mortero vidrio-vidrio, para finalmente centrifugar a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C. Todo el procedimiento se realizó en presencia continua de una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 4 mM; benzamidina 61,8 µM; leupeptina 10 µM; antipaína 2,82 µM; NaVO₄ 1 mM; NaF 2 mM y β-glicerofosfato 1 mM).

5. Cuantificación de proteínas

Se empleó el método de cuantificación de proteínas descrito por Bradford [7] en el cual se incuban 50 µL de extracto total de proteínas con 200 µL de reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250) y 750µL de solución de dilución (NaCl 0,15 M), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 595 nm. Para la curva de calibración se usó albúmina de suero bovino. Cada muestra se midió por triplicado.

6. Análisis de las proteínas por inmunquímica

Para resolver las proteínas de las muestras se utilizó electroforesis SDS-PAGE 7% en condiciones reductoras para el análisis de la integrina β4 y 9% en condiciones no reductoras para análisis de la integrina α6. Luego las proteínas fueron identificadas por inmunquímica.

6.1 Preparación de la muestra

Las muestras en condiciones reductoras fueron diluidas en relación 1:1 con tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,06 M; SDS 2% (p/v); glicerol 14% (v/v); azul de bromofenol 5%; β -mercaptoetanol 0,02%; pH 6,8). Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 100°C durante 3 minutos. En el caso de condiciones no reductoras, las muestras fueron diluidas en relación 1:1 en tampón de carga 5X, pero sin β -mercaptoetanol y sin calentamiento.

6.2 Separación electroforética de proteínas

Se depositaron alícuotas de 15 μ g dentro de los bolsillos del gel de concentración y se cubrieron con tampón de corrida (Tris 0,025 M; glicina 1,44% (p/v); SDS 0,1% (p/v); pH 8,3). La separación electroforética se inició con la aplicación de 10 mA de corriente continua hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel de separación. Luego se aplicó una corriente de 20 mA durante aproximadamente 150 minutos hasta que la muestra llegó al final del gel separador.

6.3 Western blot

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, empleando tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM; glicina 154 mM; metanol 20% (v/v); SDS 0,05% (p/v)) y aplicando una corriente de 40 mA, durante 15 horas a 4°C. Después de la transferencia, las membranas fueron lavadas en agua y teñidas con solución de Rojo Ponceau al 5% para controlar la eficiencia de la transferencia. Luego las membranas se lavaron en tampón de TBS-T (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%; pH 7,4) hasta retirar completamente la tinción. El tampón de lavado también fue usado como tampón de dilución. Seguidamente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos durante 1 hora a temperatura ambiente, con solución de bloqueo (leche descremada disuelta en el tampón de dilución). Luego se hizo la incubación con el anticuerpo primario, y posteriormente con el anticuerpo secundario, ambos a temperatura ambiente, los que fueron disueltos en solución bloqueo o en tampón de dilución (sin bloqueo) de acuerdo a la condición requerida (Tabla 4). Después de la incubación con cada anticuerpo, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno, con el mismo tampón de dilución. El revelado se hizo por quimioluminiscencia, tanto para la

proteína en estudio, como para la proteína de control de carga (β -actina). Se midió densitométricamente la intensidad de las bandas y los niveles de expresión fueron normalizados en relación con la expresión de β -actina. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de *Western blot* para la identificación de integrinas y proteínas normalizadoras.

Proteínas detectada	Solución de bloqueo	Dilución del primer anticuerpo	Tampón de dilución del primer anticuerpo	Tiempo de incubación	Dilución de segundo anticuerpo	Tampón de dilución del segundo anticuerpo	Tiempo de incubación
α 6 (NR)	10%	1:1000	TD	1 h	1:10000	SB 10%	1h
β 4 (R)	10%	1:300	TD	1 h	1:10000	SB 10%	1h
β 1 (R)	5%	1:2500	TD	1 h	1:5000	SB 5%	1h
β -actina (NR)	5%	1:7500	TD	2 h	1:5000	SB 5%	1h
β -actina (R)	4%	1:10000	SB 4 %	45 min	1:7500	SB 4%	1h

TD: Tampón de dilución (sin bloqueo), SB: Solución de bloqueo, R: reducida, NR: no reducida

7. Co-Immunoprecipitación

A una alícuota de 500 μ g de proteínas, se agregó 4 μ g de anticuerpo primario y tampón de inmunoprecipitación para condiciones nativas (Triton X-100 1%; NaCl 150 mM; Tris 10 mM; pH 8,0; EGTA 1 mM; EDTA 10 mM) hasta completar un volumen de 500 μ L, y se incubó con agitación constante durante 20 horas a 4°C. Luego, se agregó 100 μ L de proteína A-sefariosa al 30% y se incubó con agitación constante durante 2 horas a 4°C. Después de la incubación, se lavó 3 veces con el tampón de inmunoprecipitación. Para esto, se centrifugó a 8.000 x g a 4°C durante 1 minuto cada vez. El primer sobrenadante se recuperó para usarlo como control. Todo este procedimiento se realizó en presencia continua de una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 4 mM; benzamidina 61,8 μ M; leupeptina 10 μ M; antipaína 2,82 μ M; NaVO₄ 1 mM; NaF 2 mM; β -glicerofosfato 1 mM). El inmunoprecipitado se resuspendió en 30 μ L de tampón de carga y se siguió el protocolo para detección de proteínas por inmunquímica.

Las características de los anticuerpos utilizados se explicitan en la Tabla 5.

8. Inmunohistoquímica

Inmediatamente después de la biopsia, las GSLs se fijaron en paraformaldehído 1% durante 6 horas a temperatura ambiente, y luego se incluyeron en parafina en una estufa al vacío. Posteriormente fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes decrecientes en concentración, hasta llegar a agua destilada. Luego se lavó en PBS durante 5 minutos.

Para la recuperación antigénica, se digirió con pepsina 0,4% en HCl 0,01 N durante 15 minutos a 37°C, y luego se lavó 3 veces en PBS durante 5 minutos cada vez. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con caseína 0,25% durante 30 minutos. Para la detección de β_4 se incubó con anticuerpo primario 1:80 en PBS a 4°C durante 22 horas, y luego se lavó 3 veces en PBS por 5 minutos cada vez. Se continuó con la incubación del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 1:400 en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se realizaron 5 lavados en PBS durante 5 minutos cada uno, y luego 2 lavados en agua destilada. El montaje se realizó en DABCO (1,4 diazobenceno [2,2,2] octano) y Mowiol.

Tabla 5. Características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpos Primarios	
α_6	(BQ16), anticuerpo monoclonal (ratón) dirigido contra la proteína de longitud completa.
β_4	(H-101), anticuerpo policlonal (conejo) dirigido contra la secuencia de aminoácidos 28–128 correspondiente al dominio extracelular.
α_v	(21), anticuerpo monoclonal (ratón), dirigido contra la secuencia de aminoácidos 609–722.
β_1	(4B7R), anticuerpo monoclonal (ratón) dirigido contra la proteína de longitud completa.
Anti- β -actina	(C4), anticuerpo monoclonal (ratón).
Anticuerpos Secundarios	
Anti-conejo	111-035-003 anticuerpo (cabra) anti-conejo, IgG (H+L).
Anti-ratón	115-035-003 anticuerpo (cabra) anti-ratón, IgG (H+L).

9. Análisis estadístico.

Considerando el tamaño de la muestra y el tipo de variable a analizar, se compararon los resultados entre grupos de pacientes y controles usando el test de Mann-Whitney. Los valores de p obtenidos menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

La representación se realizó utilizando el gráfico de cajas. La caja muestra la distribución desde el percentilo 25 al 75, la línea horizontal representa la mediana, el punto al interior de la caja indica la media, las líneas verticales muestran la desviación estándar y las X representan el valor máximo y mínimo.

Para evaluar la significancia de la asociación de dos variables continuas, en que no existe normalidad de ellas, se usó el test de Spearman donde valores obtenidos que tienden a ± 1 indican una correlación fuerte y los que tienden a 0 indican correlación débil (valores menores a 0,4 indican correlación débil, entre 0,4 y 0,6; moderada, y mayores a 0,7; fuerte). Cuando el valor obtenido es negativo, indica que la correlación es inversamente proporcional.

RESULTADOS

1. Patrón electroforético del RNA total de glándulas salivales labiales humanas

Considerando el pequeño tamaño de las glándulas que se obtienen de cada individuo, se utilizó el sistema comercial de extracción por afinidad RNeasy de Qiagen para la extracción de RNA. Esta metodología permite extraer RNA de buena calidad en forma rápida, y libre de cualquier contaminación con compuestos fenólicos que afectan tanto la cuantificación del RNA por espectrofotometría, como la actividad enzimática de la transcriptasa reversa. Esta técnica nos permitió obtener muestras con baja contaminación de proteína. Los valores de la razón A260/A280 fueron iguales o mayores a 1,8, pero menores a 2,0.

La Figura 5 corresponde a un gel desnaturalante de agarosa-formaldehído con muestras de RNA total representativas de GSLs de individuos controles (C₁, C₂) y de pacientes (P₁, P₂). Se destacan dos bandas correspondientes a los rRNA de 28S y 18S, característicos por su abundancia en una fracción de RNA total de células eucarióticas.

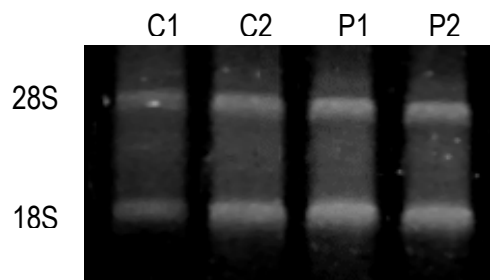


Figura 5. Detección electroforética de RNA de glándulas salivales labiales. El RNA total fue extraído en columnas de afinidad Qiagen como se especificó en Materiales y Métodos. Alícuotas de 1 µg de RNA total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalantes. Los carriles contienen muestras representativas de RNA total de GSLs de sujetos controles (C₁, C₂) y de pacientes (P₁, P₂).

2. Validación de la reacción de RT-PCR semicuantitativa para el estudio de la expresión de genes de integrina $\alpha6\beta4$ en GSLs humanas.

Para ajustar las condiciones de la reacción de PCR a nuestro sistema experimental, con el objeto que la cantidad de producto formado fuera proporcional a la cantidad de mRNA específico presente en la muestra, fue necesario, para cada gen en estudio, conocer el rango lineal de la curva de amplificación *versus* el número de ciclos y también determinar el rango lineal de la concentración de sustrato. Además, cada medición de PCR se realizó empleando tres diluciones de cDNA proveniente de GSL de cada individuo de la muestra.

Los resultados de los ensayos de validación de la reacción de RT-PCR para integrina $\alpha 6$ e integrina $\beta 4$ se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente.

Para la integrina $\alpha 6$ se detectó producto a partir de los 24 ciclos de amplificación y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 817 pb y otro de 701 pb (Figura 6A), cuyos tamaños corresponden a los esperados y los cuales han sido descritos previamente [25]. Antes de la saturación, las cinéticas de formación de ambos productos son iguales, por lo tanto para la densitometría, se consideró la intensidad total emitida por ambas señales. La curva de ciclos graficada de esta manera, presentó una zona exponencial entre los 26 y 34 ciclos y el punto de inflexión de esta curva se encontró a los 30 ciclos (Figura 6B). El producto de amplificación se detectó desde concentraciones de cDNA correspondientes a 10 ng de RNA total (Figura 6C). La curva de la densitometría de este gel mostró que el producto de amplificación fue dependiente de la cantidad de sustrato hasta los 500 ng de RNA total; el rango lineal de amplificación se presentó entre 66,6 y 500 ng de RNA total, Figura 6D.

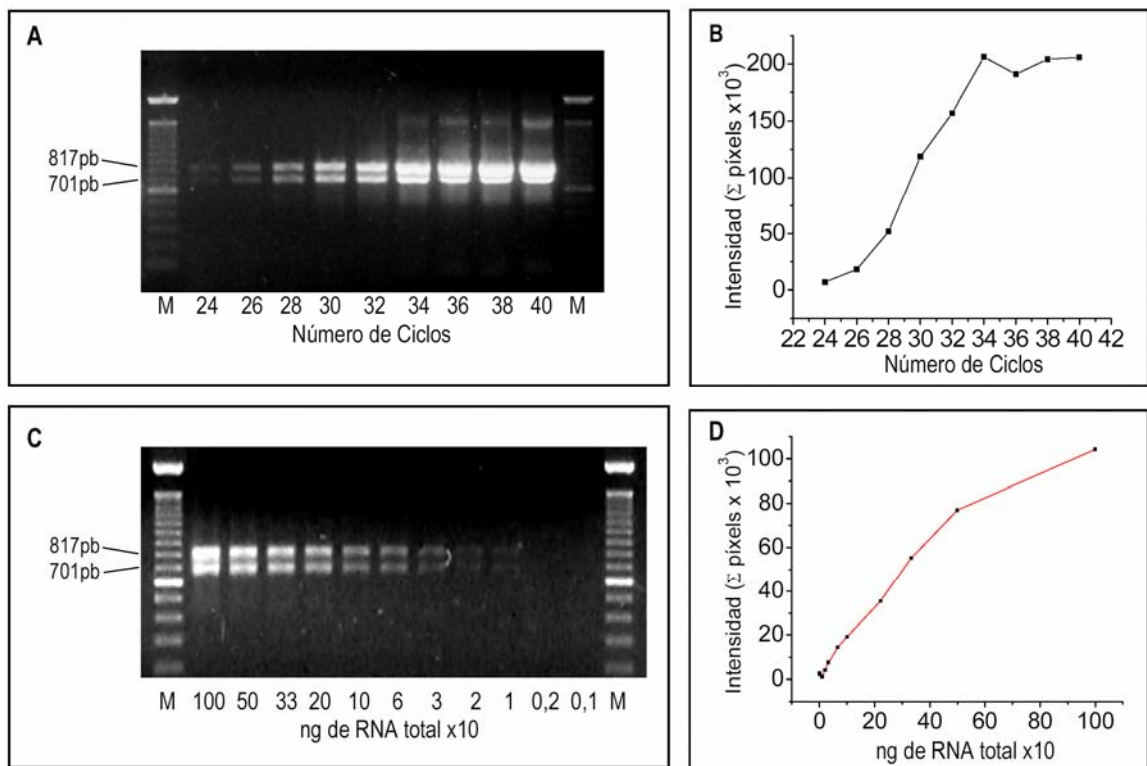


Figura 6. Determinación de las condiciones de la reacción de PCR para la integrina $\alpha 6$. (A) y (C) corresponden a geles de agarosa 1,5% (p/v) en presencia de bromuro de etidio. Cada carril fue cargado con una alícuota de 5 μ L de la reacción de PCR, desarrolladas con ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60°C y 90 segundos a 72°C. En (A) se muestra los productos de PCR tomados a diferentes ciclos de amplificación. En (C) se muestra la cantidad de producto formado, a partir de distintas cantidades iniciales de sustrato. Estas reacciones de PCR se prepararon con diluciones de cDNA correspondientes a la cantidad de RNA total inicial que se indica en las figuras 6C y 6D. Todas las reacciones se desarrollaron a 30 ciclos. En ambos geles se indican dos bandas de amplificación específica de 817 y 701pb. (B) y (D) Densitometrías de los geles A y C, respectivamente. (M: marcador de tamaño de fragmentos de DNA, donde la diferencia de tamaño entre cada banda corresponde a 100 pb).

Para la integrina $\beta 4$ se detectó el producto de amplificación desde los 24 ciclos y se obtuvo un fragmento de 413 pb, Figura 7A. La curva de ciclos presentó una zona exponencial entre los 26 y 30 ciclos, y el punto de inflexión de la curva se encontró a los 28 ciclos (Figura 7B). El producto de amplificación se detectó desde concentraciones de cDNA correspondiente a 33,3 ng de RNA total (Figura 7C). La curva de la densitometría de este gel mostró que el producto de amplificación fue dependiente de la cantidad de sustrato hasta los 500 ng de RNA, luego el rango lineal de amplificación se presentó entre 100 y 500 ng de RNA total (Figura 7D).

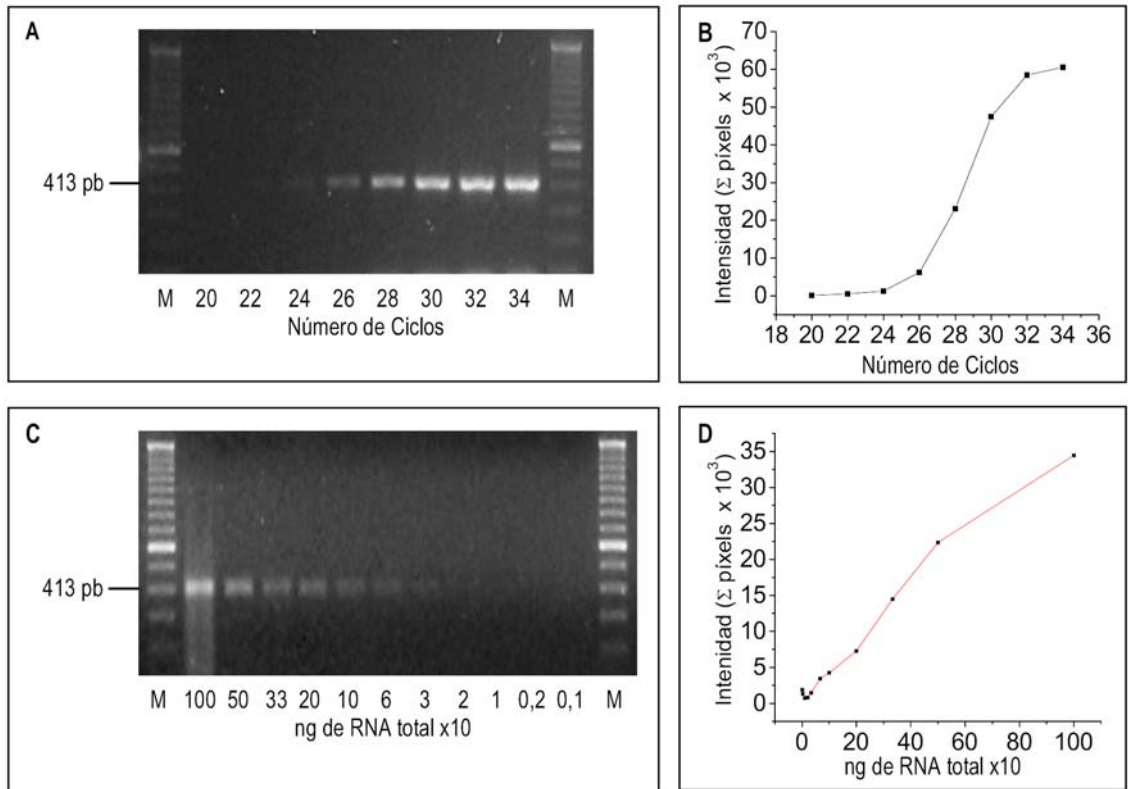


Figura 7. Determinación de las condiciones para la reacción de PCR para la Integrina $\beta 4$. **(A)** y **(C)** corresponden a geles de agarosa 1,5 % (p/v) en presencia de bromuro de etidio. Cada carril fue cargado con una alícuota de 5 μ L de la reacción de PCR, desarrolladas con ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60 °C y 90 segundos a 72°C. En **(A)** se muestran los productos de PCR tomados a diferentes ciclos de amplificación. En **(C)** se muestra la cantidad de producto formado, a partir de distintas cantidades iniciales de sustrato. Estas reacciones de PCR se prepararon con diluciones de cDNA correspondiente a la cantidad de RNA total inicial que se indica en las figuras 7C y 7D. Todas las reacciones se desarrollaron a 28 ciclos. En ambos geles se indica una banda de amplificación específica de 413 pb. **(B)** y **(D)** Densitometrías de los geles A y C, respectivamente (M: marcador de tamaño de fragmentos de DNA, donde la diferencia de tamaño entre cada banda corresponde a 100 pb).

3. Niveles relativos de los mRNA de la integrina $\alpha 6\beta 4$ en GSL de individuos controles y de pacientes

Para determinar los niveles de expresión de los genes de $\alpha 6$ y $\beta 4$, la cantidad de producto amplificado por PCR se expresó en relación a la cantidad de producto amplificado del gen de expresión constitutiva GAPDH. Operacionalmente, los niveles relativos de mRNA se calcularon dividiendo la intensidad de la banda del gen problema por la intensidad de la banda del gen de GAPDH. En consecuencia los niveles relativos de expresión corresponden a fracciones sin magnitud asociada.

Los niveles relativos de mRNA para $\alpha 6$ se encontraron en el rango de 2,3 a 38,4 en el grupo control, con un promedio de $14,14 \pm 11,6$ y en un rango de 0,4 a 31,8 con un promedio de $10,7 \pm 10,1$ en el grupo de pacientes, Figura 8A y 8B. El análisis estadístico realizado a la muestra, indicó que no existe diferencia significativa en los niveles de expresión observado en pacientes SS respecto a controles, $p = 0,49$.

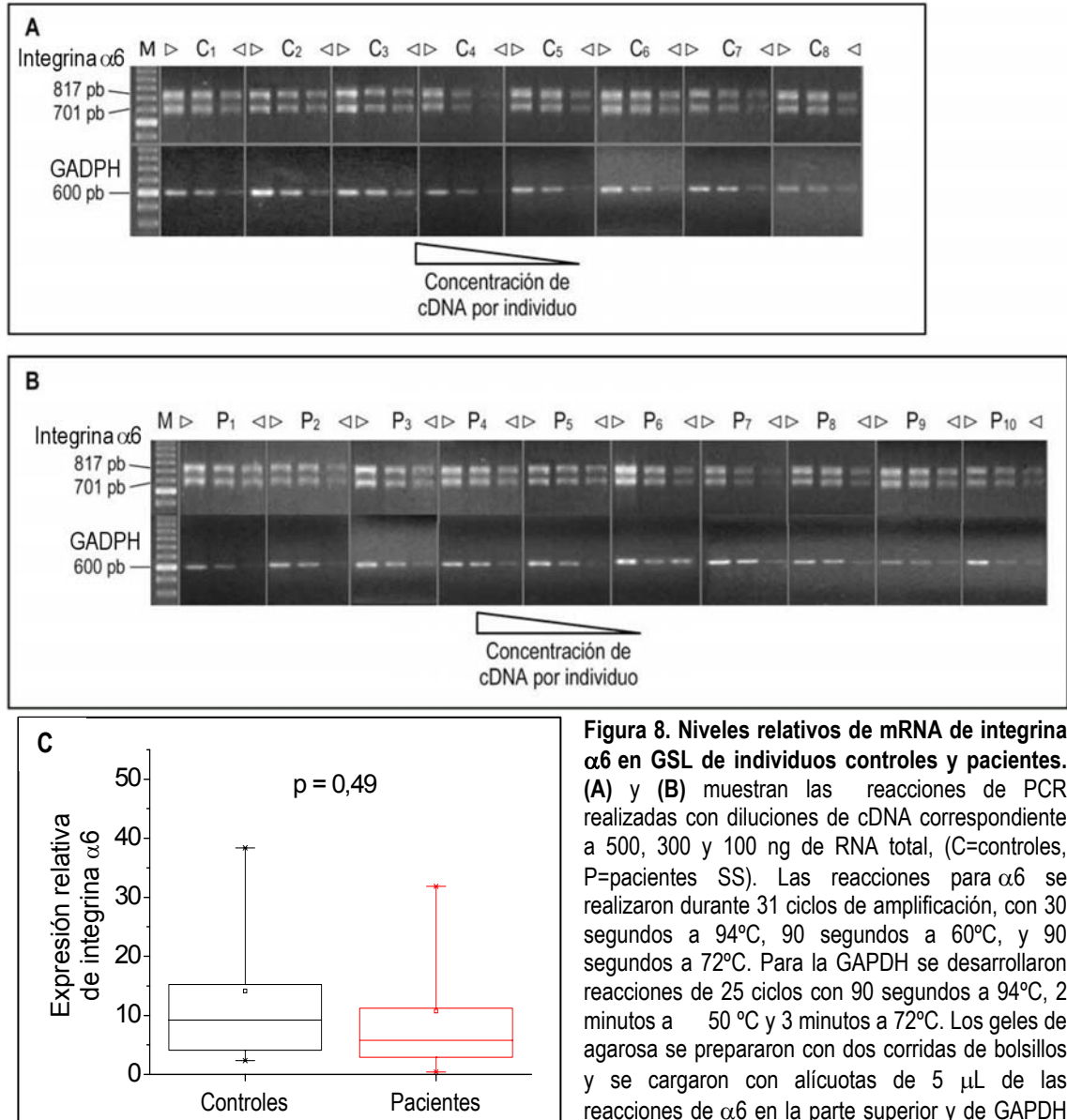


Figura 8. Niveles relativos de mRNA de integrina $\alpha 6$ en GSL de individuos controles y pacientes. (A) y (B) muestran las reacciones de PCR realizadas con diluciones de cDNA correspondiente a 500, 300 y 100 ng de RNA total, (C=controles, P=pacientes SS). Las reacciones para $\alpha 6$ se realizaron durante 31 ciclos de amplificación, con 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60°C, y 90 segundos a 72°C. Para la GAPDH se desarrollaron reacciones de 25 ciclos con 90 segundos a 94°C, 2 minutos a 50 °C y 3 minutos a 72°C. Los gels de agarosa se prepararon con dos corridas de bolsillos y se cargaron con alícuotas de 5 μ L de las reacciones de $\alpha 6$ en la parte superior y de GAPDH

en la parte inferior del gel. (C) muestra el gráfico de los niveles de expresión relativa de $\alpha 6$ en individuos controles y pacientes. Los resultados están expresados como la razón obtenida entre los productos de la reacción de PCR para $\alpha 6$ versus los productos para GAPDH. Las diferencias entre controles y pacientes no fueron estadísticamente significativas según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p = 0,49$).

Los niveles relativos de mRNA para $\beta 4$ se encontraron en el rango de 2,0 a 5,8 en el grupo control, con un promedio de $3,62 \pm 1,62$ y en un rango de 0,2 a 7,7 con un promedio de $3,30 \pm 1,98$ en el grupo de pacientes (Figura 9A y 9B). El análisis estadístico realizado a la muestra, indicó que no existe diferencia significativa en los niveles de expresión observados en pacientes SS en comparación a controles, $p = 0,71$.

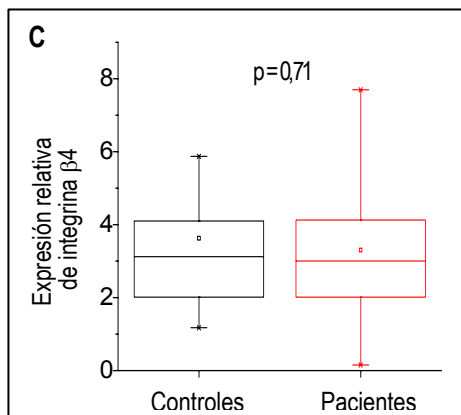
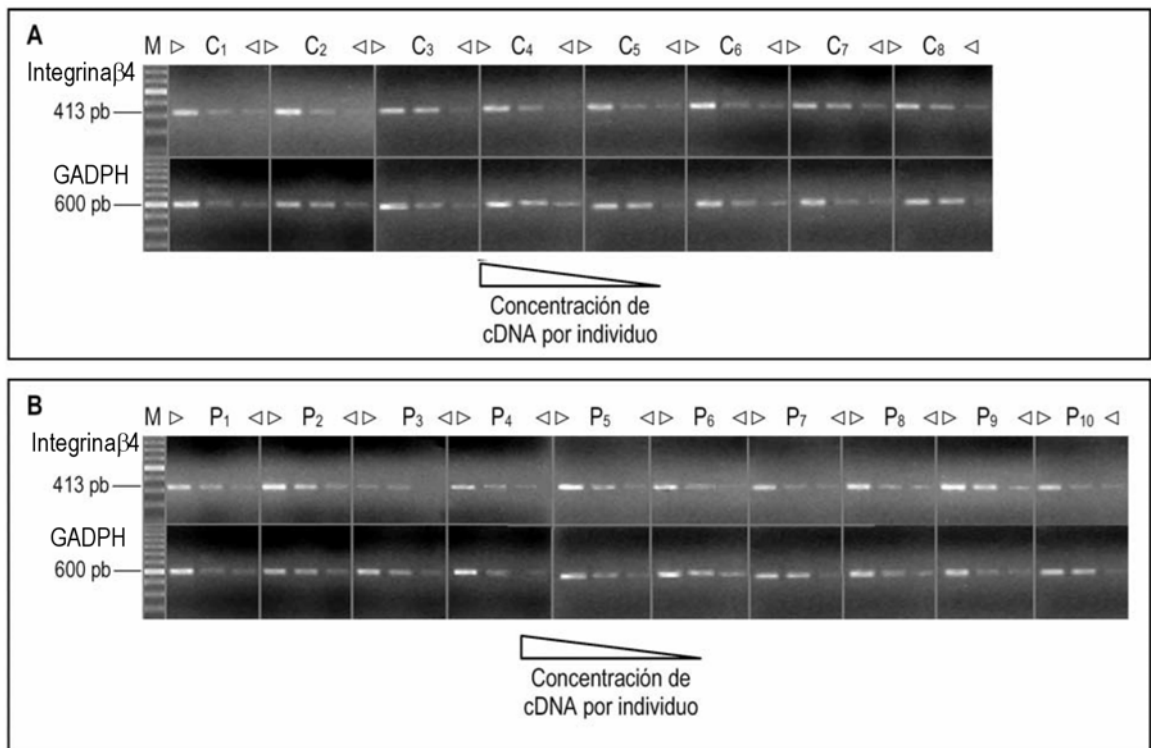


Figura 9. Niveles relativos de mRNA de integrina $\beta 4$ en GSL de individuos controles y pacientes. (A) y (B) muestran las reacciones de PCR realizadas con diluciones de cDNA correspondiente a 500, 300 y 100 ng de RNA total, (C=controles, P=pacientes SS). Las reacciones para $\beta 4$ se realizaron durante 28 ciclos de amplificación, con 30 segundos a 94°C , 90 segundos a 60°C , y 90 segundos a 72°C . Para la GAPDH se desarrollaron reacciones de 25 ciclos con 90 segundos a 94°C , 2 minutos a 50°C y 3 minutos a 72°C . Los gels de agarosa se prepararon con dos corridas de bolsillos y se cargaron con alícuotas de $5 \mu\text{L}$ de las reacciones de $\beta 4$ en la parte superior y de GAPDH en la parte inferior del gel. (C) muestra el gráfico de los niveles de expresión relativa de $\beta 4$ individuos controles y pacientes. Los resultados están expresados como la razón obtenida entre los productos de la

reacción de PCR para $\beta 4$ versus los productos para GAPDH. Las diferencias entre controles y pacientes no fueron estadísticamente significativas según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p = 0,71$).

4. Niveles relativos de las proteínas $\alpha 6$ y $\beta 4$ en GSL de individuos controles y de pacientes

Para determinar la expresión proteica de las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 4$, se realizó inmunodetección por *Western blot* a partir de extracto de proteínas de glándula completa. Los niveles de proteína se expresaron en magnitudes relativas, dividiendo los valores densitométricos de la señal de integrina por los de la proteína β -actina (~47 kDa), usada como control de carga.

4.1 Niveles relativos de proteínas de la integrina $\alpha 6$.

La detección de la integrina $\alpha 6$ se realizó bajo condiciones no reductoras, con el propósito de conservar el puente disulfuro que mantiene su estructura, y así conservar los sitios antigénicos reconocidos por el anticuerpo que está dirigido contra la proteína de longitud completa. En estas condiciones se detectó una banda con un peso aparente de 133 kDa que corresponde al esperado para esta integrina (Figura 10A).

Los niveles relativos de integrina $\alpha 6$, en el grupo control, se encontraron dentro del rango de 0,19 a 1,55 con un promedio de $0,67 \pm 0,57$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,06 a 5,97 con un promedio de $2,56 \pm 3,97$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que no existe diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p = 0,2$ (Figura 10B).

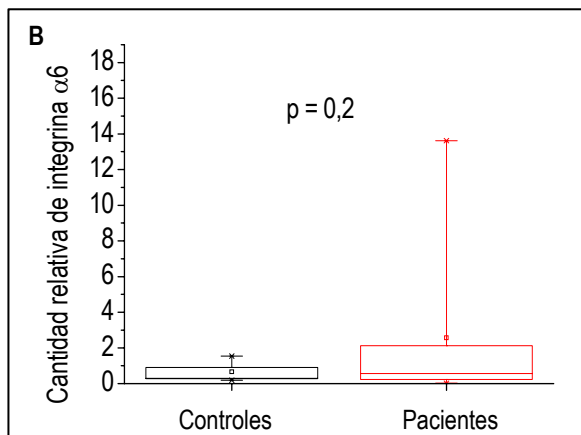
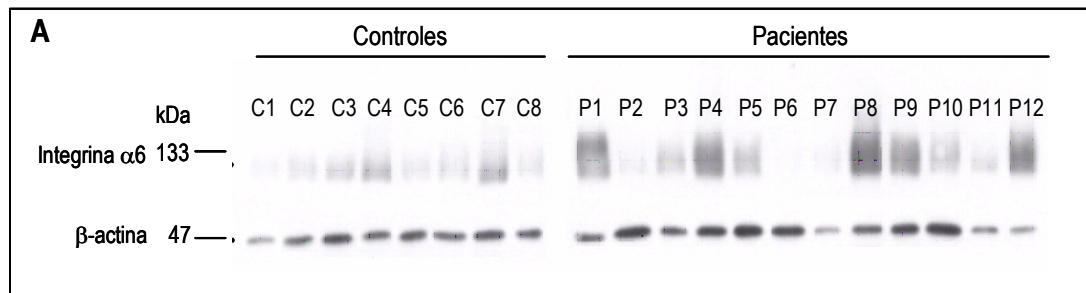


Figura 10. Detección y cuantificación proteica de la integrina $\alpha 6$. (A) El análisis de proteínas mediante *Western blot* se realizó utilizando alícuotas de 15 μ g del extracto total de proteína de GSL. Previamente estas proteínas fueron resueltas en electroforesis en condiciones desnaturalantes y no reductoras. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Se indica la banda de 133 kDa correspondiente a la integrina $\alpha 6$, y con 47 kDa, la banda de β -actina, empleada como control de carga. (B) Análisis

densitométrico de la banda de $\alpha 6$ normalizada contra β -actina. La evaluación estadística no mostró diferencias en los niveles relativos de la integrina $\alpha 6$, según el test no paramétrico de Mann-Whitney ($p = 0,2$).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, no obstante las diferencias en la expresión de esta integrina muestra en el grupo de pacientes dos tipos de señales, con altos y bajos niveles de expresión. Mientras que en los controles, todas las señales fueron de una intensidad homogénea, en pacientes se ve un grupo que presenta un patrón similar a controles (carriles P2, P3, P5, P6, P7, P10 y P11, Grupo P1), y otro que presenta una señal notoriamente más intensa (carriles P1, P4, P8, P9 y P12, Grupo P2).

Al hacer el análisis estadístico por separado de ambos grupos de expresión diferencial y compararlos con el grupo control, el grupo P1 mantuvo su falta de significancia respecto al grupo control con un valor $p = 0,296$, mientras que en el grupo P2 fue evidente la diferencia significativa respecto a controles, con un valor $p = 0,014$ (Figuras 11A y 11B).

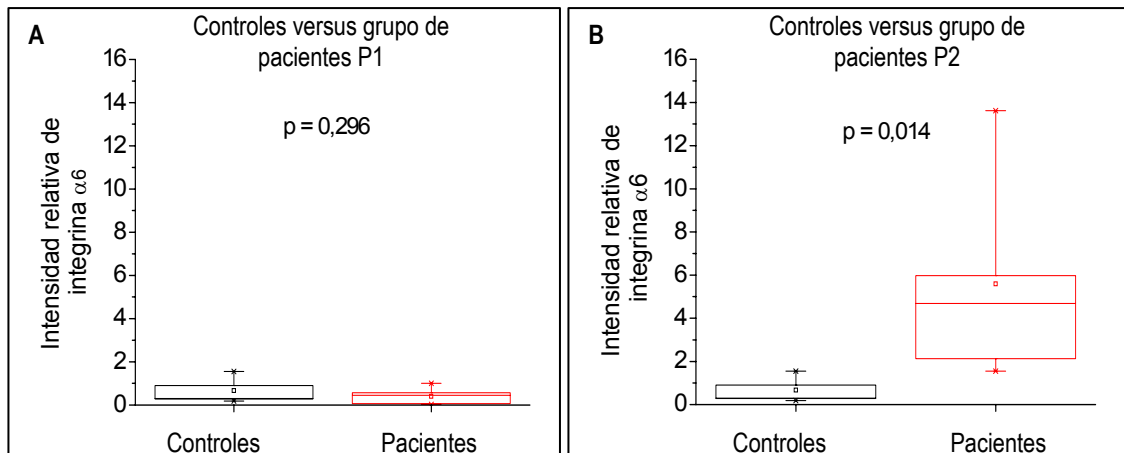


Figura 11. Comparación densitométrica de los niveles relativos de la integrina $\alpha 6$ entre pacientes SS con bandas de diferente intensidad. (A) Densitometría grupo P1 (carriles 2, 3, 6, 7, 10 y 11), cuyo análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p = 0,296$). **(B)** Densitometría grupo P2 (carriles 1, 4, 8, 9 y 12), cuyo análisis estadístico sí arrojó diferencias significativas ($p = 0,014$).

4.2 Niveles relativos de proteínas de la integrina $\beta 4$.

En el *Western blot* para la integrina $\beta 4$ realizado bajo condiciones reductoras, se detectaron tres bandas, con masas moleculares aparentes de 200, 172 y 145 kDa (Figura 12A). La de mayor masa molecular, 200 kDa, es la descrita para la integrina $\beta 4$. Como se mencionó en los antecedentes, esta integrina puede sufrir un procesamiento por la enzima calpaína, produciendo péptidos de menor tamaño, que en condiciones no reductoras tienen masas moleculares aparentes de ~ 165 , y ~ 130 kDa. Por lo tanto, se supuso que las bandas de mayor movilidad electroforética correspondían a estos fragmentos proteolíticos descritos previamente.

Considerando esta información, se cuantificó la intensidad de las tres bandas en relación con β -actina, y la sumatoria de ellas correspondió a la cantidad relativa de integrina $\beta 4$ total, la cual en el grupo control, se encontró en el rango de 1,31 a 2,56 con un promedio de $1,68 \pm 0,48$, mientras que en el grupo de pacientes SS, el rango fue de 0,28 a 2,15 con un promedio de $1,01 \pm 0,61$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p = 0,02$ (Figura 12B).

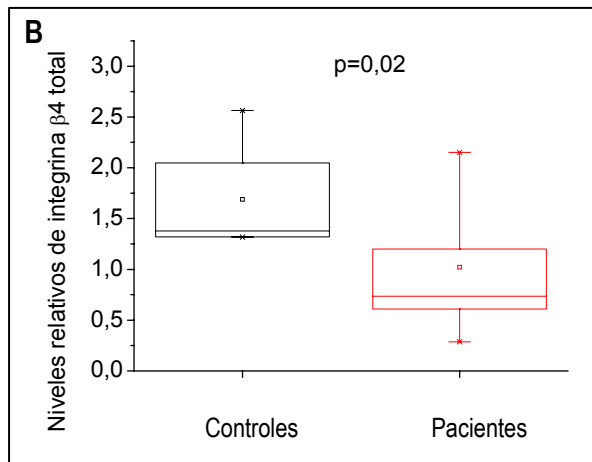
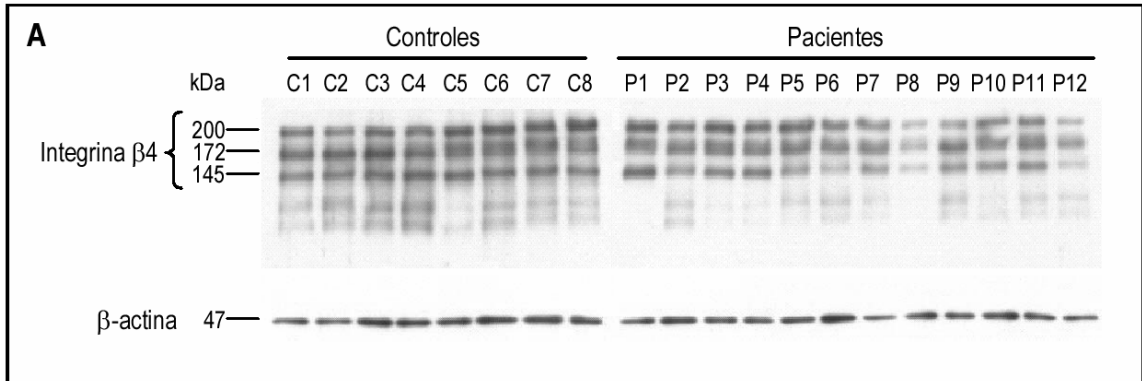


Figura 12. Detección y cuantificación proteica de la integrina $\beta 4$.

(A) El análisis de proteínas mediante *Western blot* se desarrolló con un extracto total de GSL. Cada carril fue cargado con alícuotas de 15 μ g de estos extractos. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. Las bandas señaladas corresponden a integrina $\beta 4$ intacta de 200 kDa y las bandas de 172 y 145 kDa a la integrina $\beta 4$ proteolizada. La banda de β -actina tiene una masa molecular de 47kDa.

(B) Análisis densitométrico de las

bandas de integrina $\beta 4$ total normalizadas contra β -actina. El análisis estadístico entre ambos grupos mostró una diferencia significativa en los niveles relativos de integrina $\beta 4$ total ($p = 0,02$).

4.3 Niveles de proteólisis de la integrina $\beta 4$

Considerando que las bandas de 172 y 145 kDa corresponderían a productos de proteólisis por calpaína, se cuantificó de manera separada la señal de la proteína intacta, y también la de estos productos (Figura 13). El análisis se hizo de la siguiente manera:

- Integrina $\beta 4$ intacta = Banda superior
- Producto de proteólisis = Σ (banda 172 kDa + banda 145 kDa)
- Razón de proteólisis = Σ (banda 172 kDa + banda 145 kDa) / Proteína total

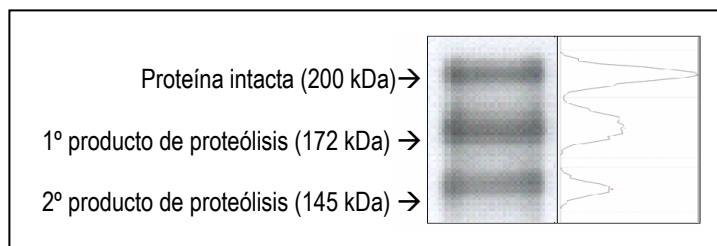


Figura 13. Las 3 señales obtenidas, con masas moleculares entre 200 y 145 kDa, fueron cuantificadas y analizadas de manera separada.

Los resultados de este análisis por separado, son los siguientes:

Los niveles relativos de integrina $\beta 4$ intacta, 200 kDa, en el grupo control, se encuentra en el rango de 0,22 a 1,01 con un promedio de $0,55 \pm 0,30$, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,05 a 0,62 con un promedio de $0,27 \pm 0,21$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p = 0,027$ (Figura 14A).

Los niveles relativos de la integrina $\beta 4$ proteolizada, 145 y 172 kDa, en el grupo control, se encuentra en el rango de 0,66 a 1,76 con un promedio de $1,14 \pm 0,36$, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,3 a 1,52 con un promedio de $0,75 \pm 0,41$. El análisis estadístico realizado a la muestra, indicó que existe una diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p = 0,045$ (Figura 14B).

Las razones de proteólisis se encontró en el rango de 0,49 a 0,82 con un promedio de $0,68 \pm 0,13$ en el grupo control, mientras que en el grupo de pacientes, el rango es de 0,58 a 0,91 con un promedio de $0,74 \pm 0,09$. El análisis estadístico realizado a la muestra indicó que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos, con un valor de $p = 0,18$ (Figura 14C).

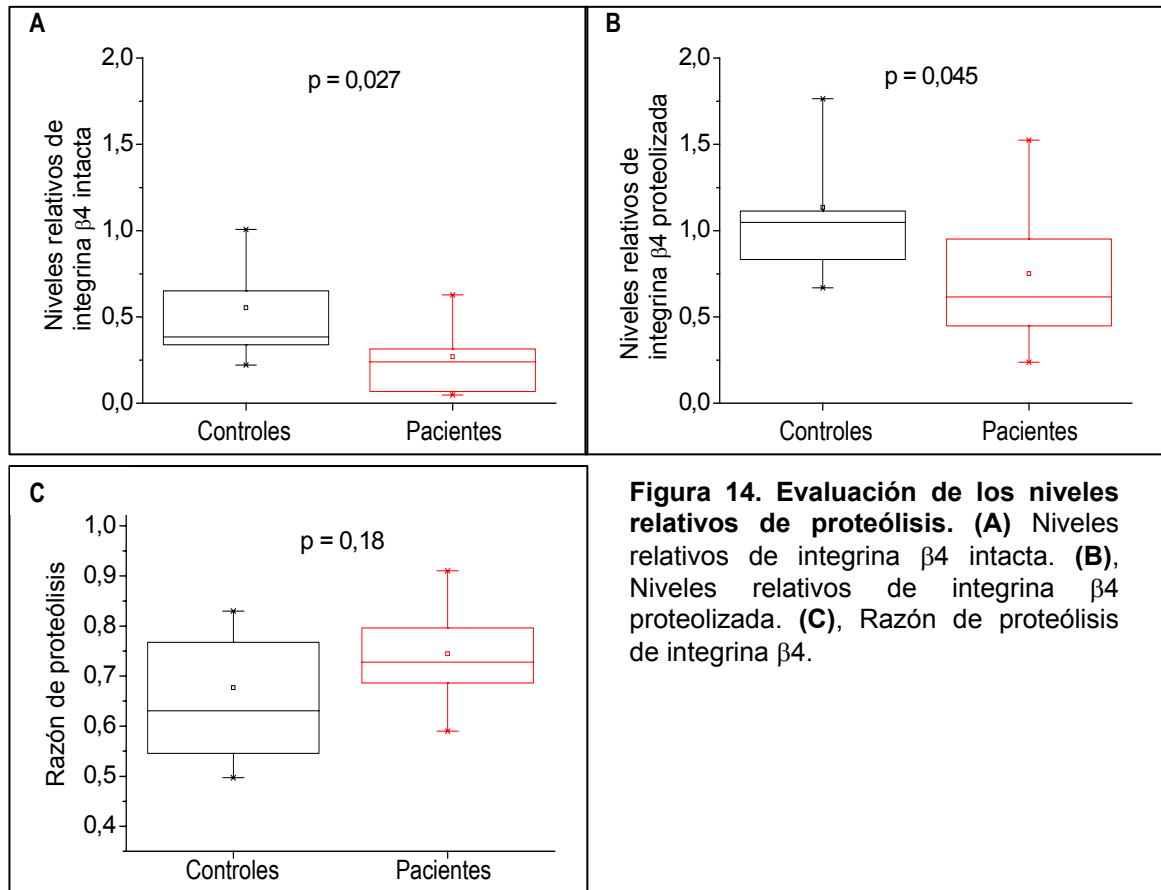


Figura 14. Evaluación de los niveles relativos de proteólisis. (A) Niveles relativos de integrina $\beta 4$ intacta. **(B)**, Niveles relativos de integrina $\beta 4$ proteolizada. **(C)**, Razón de proteólisis de integrina $\beta 4$.

La calpaína es una enzima que para actuar necesita cantidades micromolares de Ca^{+2} . Antecedentes demuestran que su actividad puede ser inhibida tanto por la adición de inhibidores específicos, o bien con el uso de EGTA, en concentración 10 mM en el tampón de extracción de proteínas [18, 46].

Se hizo *Western blot* de GSLs de algunos individuos de ambos grupos, usando el protocolo descrito en Materiales y Métodos, pero la extracción de proteínas totales se realizó usando sólo la mitad de la concentración de EGTA, es decir 5 mM. El resultado fue dramáticamente distinto (Figura 15). Mientras en algunas muestras se mantuvo el patrón de 3 bandas (carriles C3, C6, P1, P5 y P6), en otras, la banda que corresponde a integrina $\beta 4$ intacta, desapareció casi por completo (carriles C1, C2, C4, C5, P2, P3, P4). Sin embargo, las bandas de 172 y 145 kDa se detectaron en todos los individuos analizados.

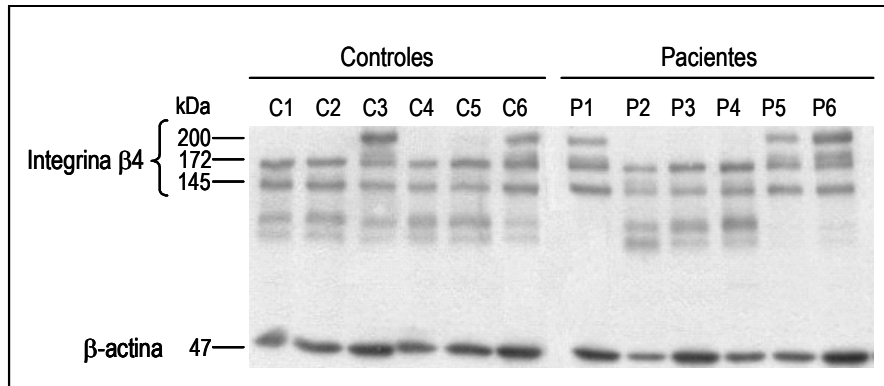


Figura 15. Efecto de EGTA 5mM en la proteólisis de la integrina $\beta 4$. El análisis de proteínas mediante *Western blot* para detectar la integrina $\beta 4$ se realizó usando extractos de GSL totales conteniendo concentraciones de EGTA 5mM en el tampón de extracción. Cada carril contiene 15 μ g de extracto total de proteínas provenientes de GSL de individuos controles (C) y de pacientes (P). La banda de 200 kDa corresponde a la integrina $\beta 4$ intacta, y las de 172 y 145 kDa a la integrina $\beta 4$ proteolizada. La banda de 47 kDa corresponde a β -actina.

4.4 Determinación de la capacidad de unión entre los productos proteolizados de la integrina $\beta 4$ con $\alpha 6$ en GSL de pacientes SS

Debido a la proteólisis parcial de la integrina $\beta 4$, era necesario establecer si los péptidos producidos, de 172 y 145 kDa, eran capaces de mantener el dímero $\alpha 6\beta 4$. Para determinar ésto, se hizo co-inmunoprecipitación de $\beta 4$, utilizando anticuerpos anti- $\alpha 6$ y luego detección de $\beta 4$ por *Western blot*. En la Figura 16 se aprecia que tanto en controles, como en pacientes, cuando se utilizó el anticuerpo anti- $\alpha 6$ para la inmunoprecipitación, se detectaron las tres formas de $\beta 4$ descritas anteriormente (200, 172 y 145 kDa). Al contrario, cuando se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra una integrina que no forma dímero con la integrina $\beta 4$, como es la integrina αV , la integrina $\beta 4$ no fue detectada en el *Western blot*.

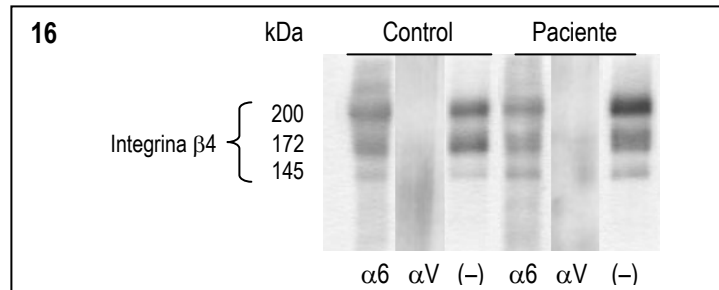


Figura 16. Co-inmunoprecipitación de productos proteolizados de la integrina $\beta 4$. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos contra la integrina $\alpha 6$ y como control se empleó anticuerpo contra la integrina αV . La detección de las proteínas inmunoprecipitadas se realizó mediante *Western blot* para identificar la integrina $\beta 4$. (–) En este carril se detectó $\beta 4$ en el extracto total de proteínas sin inmunoprecipitar.

5. Comparación de los niveles relativos de la integrina $\alpha 6$ y de integrina $\beta 1$ en pacientes SS

Con el propósito de dilucidar las diferencias en la intensidad para la integrina $\alpha 6$ observada en los pacientes SS se realizó una evaluación de los niveles de expresión de la integrina $\beta 1$. Este análisis se fundamentó en dos hechos, el primero es que la integrina $\alpha 6$ puede formar dímeros con las integrinas $\beta 1$ ó $\beta 4$. El segundo se fundamentó en que la integrina $\alpha 6\beta 1$ se expresa en epitelios y en células del infiltrado inflamatorio [61]. Estas últimas se encuentran aumentadas en las GSLs de pacientes con SS. Por estas razones, fue necesario analizar los niveles de la integrina $\beta 1$ para comparar con los de $\alpha 6$ y resolver si las notorias diferencias en los niveles relativos de integrina $\alpha 6$ dentro del grupo de pacientes SS podrían deberse a un aporte no considerado de integrina $\alpha 6\beta 1$ por parte de las células inflamatorias.

Se hizo *Western blot* con extractos de proteínas de glándula completa, y los resultados muestran niveles relativos de integrina $\beta 1$ muy parecidos entre ambos grupos (Figura 17). En el grupo control, los niveles relativos de integrina $\beta 1$ están en el rango de 0,58 a 2,89, con un promedio de $1,70 \pm 0,72$, mientras que en el grupo de

pacientes, el rango es de 0,51 a 2,60, con un promedio de $1,57 \pm 1,73$. El valor de $p = 0,72$, indica que no hay diferencias significativas.

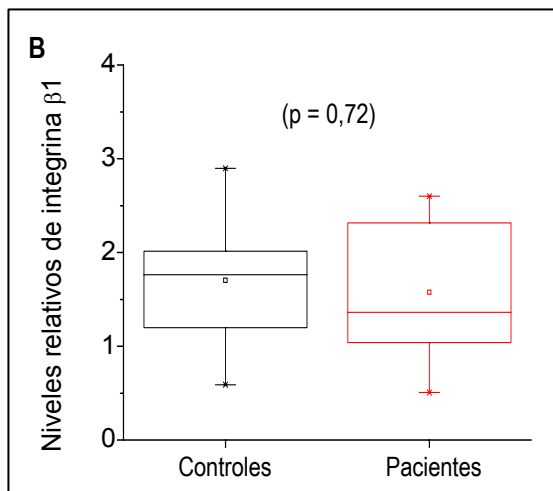
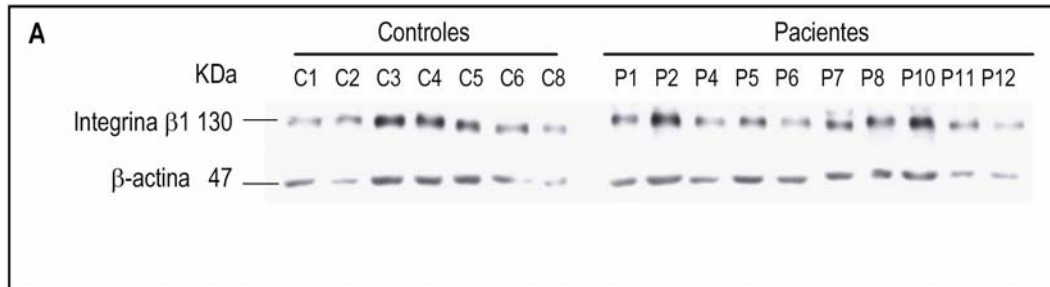


Figura 17. Detección y cuantificación proteica de la integrina $\beta 1$. (A) El análisis de proteínas mediante *Western blot* se desarrolló con un extracto total de GSL. Cada carril fue cargado con alícuotas de 15 μg de estos extractos. Los carriles indicados con C corresponden a los individuos controles y con P a pacientes SS. La banda señalada corresponde a integrina $\beta 1$ de 130 kDa. La banda de β -actina tiene una masa molecular de 47kDa. (B) Análisis densitométrico de las bandas de integrina $\beta 4$ total normalizadas contra β -actina. El análisis estadístico entre ambos grupos no mostró diferencia significativa en los niveles relativos de integrina $\beta 1$ ($p = 0,72$).

En la Figura 18 se muestra la comparación caso a caso de los niveles relativos de las integrina $\alpha 6$ y $\beta 1$. Estos niveles no mostraron ninguna relación entre ambas integrinas. Los individuos que para $\alpha 6$ mostraron altos niveles (columnas P1, P4, P8, P9 y P12), para $\beta 1$ presentaron niveles completamente dentro del rango promedio.

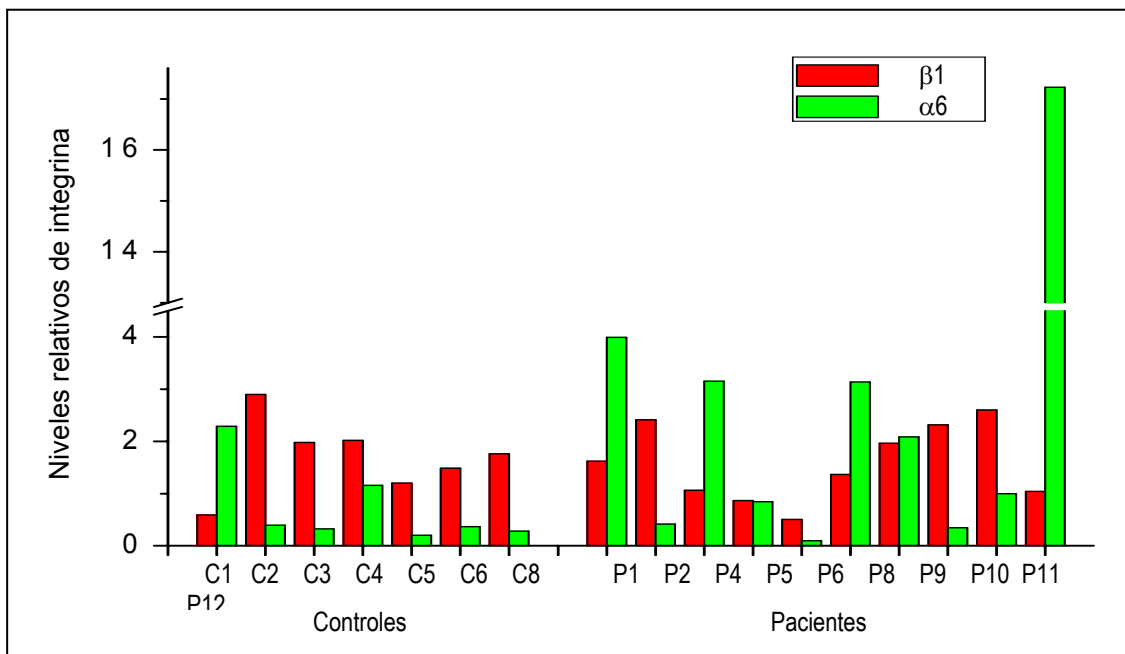


Figura 18: Niveles relativos de las integrinas $\beta 1$ (rojo) y $\alpha 6$ (verde) determinada caso a caso.

6. Distribución subcelular de la integrina $\beta 4$ en GSL de pacientes SS

Primero se estudió la localización de la integrina $\beta 4$ en acinos y ductos de GSLs de individuos controles y pacientes con SS. Si esta integrina se encuentra en la superficie de la célula será considerada como un indicador de la presencia del dímero $\alpha 6\beta 4$, ya que sólo en esas condiciones es destinada a ese compartimiento subcelular. Además, esta localización se analizó en conjunto con laminina, con el propósito de evaluar si los cambios en la lámina basal modifican el patrón de distribución de esta integrina. Para ello, se utilizó inmunofluorescencia confocal. En las Figuras 19 y 20 se muestra la distribución por separado y colocalización de la Integrina $\beta 4$ y laminina en cortes de GSLs provenientes de individuos controles.

En la Figura 19A se puede observar que la Integrina $\beta 4$ se localiza en la superficie basolateral de células serosas y sólo en basal de células mucosas y ductos, en Figura 19C se observan zonas de fluorescencia amarilla que indica la colocalización de estas moléculas. Los vasos sanguíneos no presentan inmunorreactividad para $\beta 4$. En la figura 20 se destaca muy claramente la distribución y colocalización en un acino seromucoso.

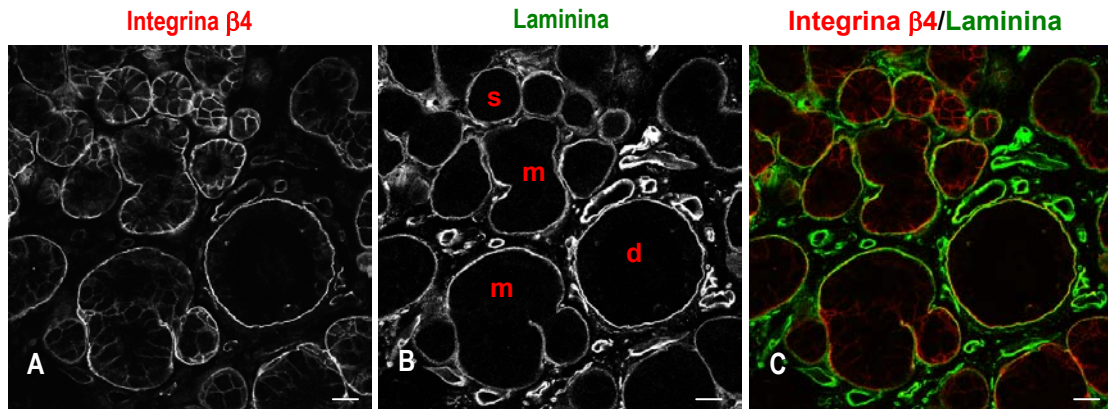


Figura 19. Distribución y colocalización de integrina $\alpha\beta4$ y laminina en secciones de glándulas salivales de individuos controles. En (A) se muestra la localización y distribución de integrina $\beta4$, en (B) de laminina y se señalan los acinos serosos (s), acinos mucosos (m) y ductos (d) y en (C) se muestra la colocalización de ambas moléculas. Las imágenes (A) y (B) se muestran en blanco y negro para resaltar la señal. (Barra: 22 μm)

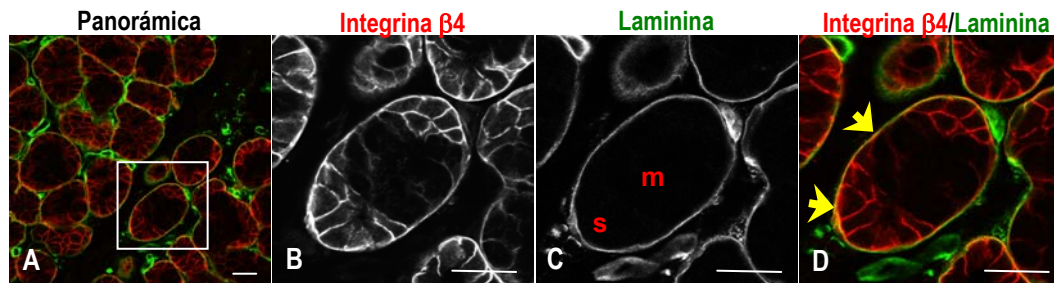


Figura 20. Distribución de integrina $\alpha\beta4$ y laminina en un acino sero-mucoso en secciones de glándulas salivales de individuos controles. En (A) se muestra una visión panorámica de una zona ampliada, y mostrada en el recuadro blanco, un corte longitudinal de un acino sero-mucoso. En (B) se destaca con mucha claridad la distribución de la integrina, en (C) se observa una lámina basal muy bien definida y en (D) la colocalización de ambas moléculas en casi toda la superficie de células serosas y mucosas, señalada con flechas amarillas. Las imágenes (B) y (C) se muestran en blanco y negro para resaltar la señal. (Barra: 22 μm).

En la figura 21, se muestran cuatro secciones provenientes de diferentes pacientes donde se destacan algunos de los cambios más frecuentes observados en las glándulas salivales de pacientes con SS. En todas ellas se muestra una vista panorámica y un recuadro de la sección que se quiere destacar. En las Figuras 21A–D se muestra la observación más frecuente, ésta es el incremento en inmunofluorescencia en los acinos mucosos, en general con mantención de la integridad de la lámina basal. En la porción serosa que señala la flecha roja (Figura 21D) se observa desorganización en lámina basal y en el patrón de distribución de la integrina.

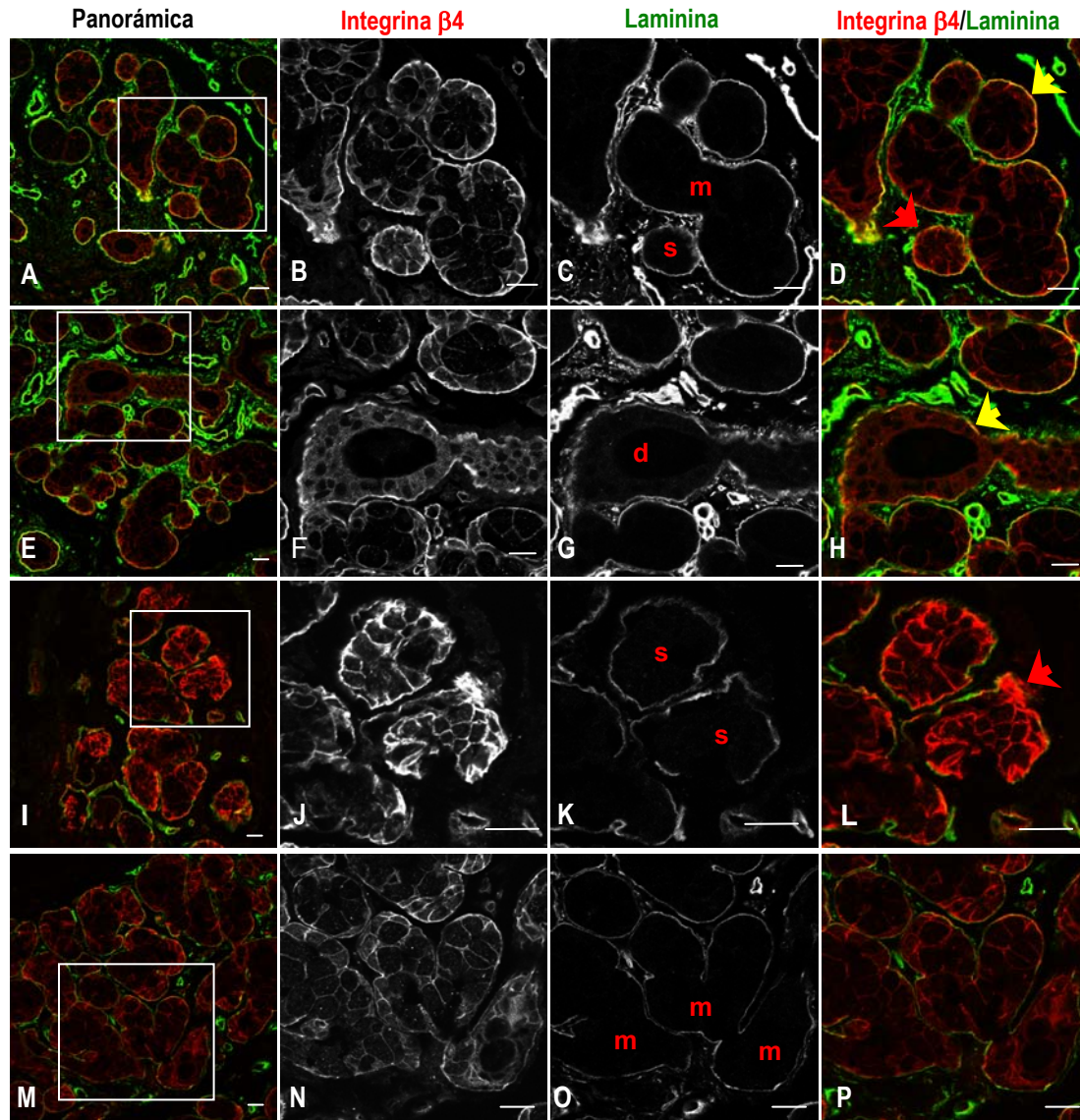


Figura 21. Distribución y colocalización de integrina $\alpha 6\beta 4$ y laminina en secciones de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren. En (A), (E), (I) y (M) se muestra una visión panorámica de una zona donde se amplifica una región en recuadro blanco que muestra secciones provenientes de 4 pacientes. (A)–(D) muestra un incremento de la inmunofluorescencia en acinos mucosos, sin mayores cambios en lámina basal. (E)–(H) se observa un ducto con pérdida y discontinuidad de la integrina y laminina, sin embargo hay pequeñas zonas de colocalización (flecha amarilla). (I)–(L) se muestra desorganización de acinos serosos acompañada de un drástico aumento de inmunofluorescencia citoplasmática de la integrina y pérdida total de colocalización con laminina (flecha roja). En (M)–(P) se detecta un patrón muy similar al recién descrito, pero en acinos mucosos. Flechas amarillas: zonas de colocalización, Flechas rojas: zonas de desorganización sin colocalización. Las imágenes centrales se muestran en blanco y negro para resaltar la señal. (Barra: 22 μm)

Aún hay zonas de colocalización, indicadas por la flecha amarilla. En las Figuras 21E–H, se muestra pérdida de inmunofluorescencia para ambas moléculas en un ducto, sin infiltrado linfocitario. En las Figuras 21I–L, se observa un cambio dramático en la distribución de la integrina $\beta 4$ en acinos serosos, mostrando un aumento importante de ella a nivel citoplasmático y las láminas basales con pérdida de continuidad. Esta observación fue observada en 3/10 pacientes, también se observa una pérdida completa de colocalización. En las Figuras 21M–P se destaca una situación similar a la recién descrita, pero observada en acinos mucosos.

7. Correlación entre niveles relativos de integrina $\alpha 6\beta 4$ y algunos parámetros morfológicos

Se hizo un correlación entre los niveles relativos de integrina $\alpha 6$ y $\beta 4$ (incluyendo los parámetros previamente señalados en la Figura 13) y parámetros morfológicos como fibrosis, cantidad de parénquima y organización acinar. Estos se determinaron a través una clasificación visual mediante microscopía de luz de secciones de GSLs de controles y pacientes SS y se ordenó cada variable en forma ascendente (de menos organizado a más organizado, de menos parénquima a más parénquima y de menor a mayor grado de fibrosis). Luego, se hizo un análisis estadístico de correlación usando el test de Spearman. Los resultados para controles y pacientes SS se detallan en las Tablas 6 y 7. Los distintos valores se han destacado según su nivel de correlación:

	Correlación fuerte
	Correlación moderada
	Correlación débil

Tabla 6. Valores de correlación para controles.

	$\beta 4$ intacta	$\beta 4$ total	$\beta 4$ proteolizada	Razón de proteolisis	$\alpha 6$
Organización	0.111	0.000	-0.037	-0.222	0.185
Parénquima	0.632	0.000	-0.632	-0.791	-0.158
Fibrosis	-0.306	0.342	0.613	0.378	-0.162

Tabla 7. Valores de correlación para pacientes SS.

	$\beta 4$ íntacta	$\beta 4$ total	$\beta 4$ proteolizada	Razón de proteólisis	$\alpha 6$
Organización	-0.856	-0.852	-0.813	0.588	-0.007
Parénquima	0.397	0.600	0.676	-0.243	0.025
Fibrosis	-0.043	-0.279	-0.414	-0.111	-0.704

Según este análisis:

- **A nivel de organización de acinos:**

En controles no hay correlación con ninguno de los parámetro evaluados.

En pacientes, a menor organización acinar (mayor pérdida de organización), mayor cantidad de integrina $\beta 4$ total, íntacta y proteolizada (correlación fuerte). A mayor organización, mayor razón de proteólisis (correlación moderada).

- **A nivel de cantidad de parénquima:**

En controles, a mayor cantidad de parénquima, mayor cantidad de integrina $\beta 4$ íntegra, y también menos $\beta 4$ proteolizada (correlación moderada). También a mayor parénquima, menor razón de proteólisis (correlación moderada).

En pacientes, a mayor cantidad de parénquima, mayor cantidad de integrina $\beta 4$ íntegra (correlación débil). También, a mayor cantidad de parénquima, mayor cantidad de $\beta 4$ total y proteolizada (correlación moderada).

- **A nivel de fibrosis:**

En controles, a mayor grado de fibrosis, menor cantidad de integrina $\beta 4$ íntegra y mayor cantidad de $\beta 4$ total y razón de proteólisis (correlación débil). También, mayor cantidad de $\beta 4$ proteolizada (correlación moderada).

En pacientes, a mayor cantidad de fibrosis, menor cantidad de $\beta 4$ proteolizada (correlación moderada), y también menor cantidad de $\alpha 6$ (correlación fuerte).

DISCUSIÓN

En esta tesis se determinó si en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren la pérdida de adhesión celular y la sobreexpresión de laminina-5, se acompañan de una sobreexpresión y/o una redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$. Estos cambios en la integrina $\alpha6\beta4$ podrían corresponder a un mecanismo de rescate a la muerte de las células acinares por anoikis, que es la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje mediado por integrinas. Para esto, se estudiaron los niveles de mRNA y proteínas de la integrina $\alpha6\beta4$ y su distribución en la superficie de las células acinares de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

A nivel de mRNA, el partidor usado para $\alpha6$, permitió la detección de dos productos, de 817 y 701 pb, y que corresponden a las isoformas $\alpha6A$ y $\alpha6B$, respectivamente [25]. Esto demuestra que en glándulas salivales labiales, tanto de individuos controles, como de pacientes con síndrome de Sjögren, se expresan ambas isoformas de la integrina $\alpha6$. La presencia de estas isoformas en glándulas salivales normales ha sido descrita previamente [5, 25]. Ambas isoformas presentaron cinéticas de formación similar (productos *versus* ciclos de amplificación), por lo tanto para los análisis estadísticos, se utilizó la sumatoria de ambas señales. Cabe mencionar también, que en el caso del dímero $\alpha6\beta4$, la presencia de una u otra isoforma de $\alpha6$, no implica diferencias de especificidad hacia el ligando [40]. Tras el análisis, no se encontraron diferencias significativas en los niveles relativos de mRNA entre controles y pacientes ($p = 0,49$).

Para la integrina $\beta4$, el partidor permitió la detección de un producto de 413pb, que corresponde al precursor mRNA de esta proteína. De manera análoga a $\alpha6$, el análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas en los niveles relativos de mRNA de integrina $\beta4$ entre pacientes y controles ($p = 0,71$). A diferencia de lo esperado, los niveles relativos de la integrina $\alpha6\beta4$ entre pacientes y controles, se mantuvieron sin diferencias significativas, mostrando que no hay cambios en la expresión génica de estas proteínas.

En el análisis de los niveles de proteínas mediante *Western blot*, para la integrina $\alpha6$, se obtuvo una banda de 133 kDa, peso molecular esperado para la

integrina $\alpha 6$ [56]. Esta banda correspondería a ambas isoformas ($\alpha 6A$ y $\alpha 6B$), pero no fue posible discriminarlas como bandas separadas, debido a la mínima diferencia de peso molecular entre ellas y por las condiciones no reductoras usadas para la separación. Además, el grado de glicosilación de esta integrina favorece a que la banda se presente difusa. El análisis densitométrico de la banda de esta integrina no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio ($p = 0,2$), sin embargo, al analizar el *Western blot* de esta proteína (Figura 10A) se observó claramente que en el grupo de pacientes había dos sub-grupos; uno de expresión similar a controles, señalados como pacientes con niveles bajos de expresión, y otro notoriamente más alto, señalado como pacientes con niveles altos de expresión. Al analizar de manera separada estos subgrupos, los pacientes con niveles bajos de expresión mantuvieron su diferencia no significativa respecto al grupo control ($p = 0,296$), sin embargo el grupo de pacientes con niveles altos sí presentó una diferencia significativa respecto al grupo control ($p = 0,014$). Este último resultado no muestra una relación directa respecto a los obtenidos por PCR, por lo tanto, se hicieron nuevos análisis, los que serán revisados más adelante.

Para la proteína $\beta 4$ se obtuvo un patrón de tres bandas, las que según sus masas moleculares aparentes corresponden a la integrina $\beta 4$ intacta y dos productos, que por su patrón de migración, podrían corresponder a proteólisis de $\beta 4$ por calpaína (ambas isoformas) [18, 46]. Al analizar la expresión total de esta proteína, que es la sumatoria de las tres bandas, se obtuvo una diferencia significativa entre controles y pacientes ($p = 0,02$), con una expresión menor en pacientes. También se observó un par de bandas de menor masa molecular, 122 y 110 kDa, pero no hay certeza acerca de su origen, no obstante, podrían corresponder a otros productos de proteólisis no descritos de $\beta 4$.

Los resultados obtenidos, tanto para $\alpha 6$ como para $\beta 4$, no mostraron una relación directa entre los niveles de mRNA y los niveles de proteínas, lo que sugiere posibles cambios a nivel de la regulación post-transcripcional.

Se analizó de manera separada cada una de las tres bandas que correspondían a $\beta 4$ intacta y sus productos de proteólisis. Sin embargo, el resultado obtenido no fue distinto al de la proteína total; en ambos casos, los niveles relativos, tanto de proteína

intacta como proteolizada, son significativamente mayores en controles. No obstante, al analizar la razón de proteólisis, el resultado fue inverso, los pacientes mostraron una razón mayor a los controles, aunque esta diferencia no fue significativa ($p = 0,18$).

Para analizar el supuesto procesamiento por calpaína, una enzima proteolítica que para actuar necesita cantidades micromolares de Ca^{+2} , se usó EGTA 5 mM, que corresponde sólo a la mitad del usado para hacer las extracciones de proteínas de la manera descrita en Materiales y Métodos. El resultado obtenido fue muy interesante, como se advierte al comparar las Figuras 12 y 15. Con una alta incidencia en pacientes y controles, la banda de 200 kDa, que corresponde a la integrina $\beta 4$ intacta, ha desaparecido, mientras que las bandas de 172 y 145 kDa continúan siendo detectadas. Este resultado coincide con lo descrito en otros estudios para el procesamiento por calpaína, donde una concentración de EGTA de 10 mM, es capaz de detener completamente la actividad de esta enzima, mientras que la mitad, 5 mM, no es capaz de bloquear su acción, produciendo péptidos de los tamaños obtenidos. Esto apoya la idea de la proteólisis por calpaína, y demuestra un intenso procesamiento, en pacientes y controles. Además, dado que los estudios de los niveles de proteínas se hicieron usando una concentración de EGTA 10 mM, cantidad suficiente para bloquear completamente la actividad de calpaína, podemos decir que la proteólisis observada se produce *in vivo*, y no sería un artefacto de la extracción de proteínas. Luego, al continuar analizando la Figura 15, se aprecia que el duplete de masa molecular menor, 122 y 110 kDa, se intensificó, lo que sugiere que también corresponderían a péptidos no descritos de la proteólisis de $\beta 4$. Por lo tanto, se descarta la posibilidad de que una de estas bandas correspondiera a la isoforma $\beta 4E$.

Estos resultados podrían indicar que los niveles relativos de integrina $\beta 4$ en pacientes, serían menores a los obtenidos en controles, debido a una proteólisis mayor, que si bien no es significativa, para el caso de la producida por calpaína, ésta podría sumarse a otro mecanismos de procesamientos no estudiados, y producir una proteólisis total que sí sea significativa. Cabe recordar, que se han descrito procesamientos de $\beta 4$ por MMPs [60], y que algunas de éstas se encuentran aumentadas en los pacientes con síndrome de Sjögren [24, 44].

Para determinar la capacidad de unión de los productos proteolizados de $\beta 4$ con la integrina $\alpha 6$, se hizo un ensayo de co-inmunoprecipitación que demostró que al igual que con la proteína $\beta 4$ intacta, la integrina $\alpha 6$ también es capaz de mantenerse unida a los péptidos de 172 y 145 kDa (Figura 16).

Como se sabe, la proteólisis por calpaína se produce cuando la integrina $\beta 4$ se encuentra en la superficie celular [18], y para que esta proteína se ubique en este lugar, debe hacerlo dimerizada con la integrina $\alpha 6$. En consecuencia, el corte por calpaína, no modificaría la mantención de la forma dimerizada. Esto ha sido descrito en otros estudios, y las dos formas procesadas de $\beta 4$ permanecerían asociadas a $\alpha 6$ en la superficie celular [46].

Para determinar si las diferencias en los niveles relativos de la integrina $\alpha 6$ en el grupo de pacientes, podría deberse a un aporte no considerado de parte del infiltrado linfocitario, que también expresa el dímero $\alpha 6\beta 1$ [61], se midieron los niveles relativos de integrina $\beta 1$ en controles y pacientes, encontrándose niveles muy parecidos, y que no guardan ninguna relación con los niveles obtenidos para la integrina $\alpha 6$. De hecho, al comparar los niveles de integrina $\alpha 6$ y $\beta 1$ por individuo (Figura 18), se confirma el comportamiento no relacionado. Es decir, pacientes que muestran gran cantidad de $\alpha 6$, muestran valores de $\beta 1$ similares o incluso menores que los pacientes que presentan valores normales de $\alpha 6$. Se puede decir entonces que las diferencias en los niveles de $\alpha 6$ en el grupo de pacientes, no se debe a un aporte de linfocitos. Por lo tanto, al igual que como se ve para la integrina $\beta 4$, debe haber una regulación post-transcripcional que afecte los niveles detectados. Como una forma de regular la señalización bidireccional, se han encontrado procesamientos a nivel post-traduccionales de dominios citoplasmáticos de integrinas localizadas en la membrana plasmática, tales como el sufrido por la integrina $\beta 3$ en plaquetas, que mediante un procesamiento por calpaína regula la capacidad de unión a su ligando [29, 52].

En el caso de $\alpha 6$, podría haber algún mecanismo de proteólisis que en algunos pacientes, a la inversa del caso de $\beta 4$, podría estar actuando a una razón menor, lo que se traduce en mayor cantidad relativa de integrina $\alpha 6$. Dada la naturaleza del anticuerpo, que reconoce solamente a la integrina $\alpha 6$ de longitud completa, no es

posible detectar péptidos de esta integrina de menor masa molecular que pudieran ser generados por algún procesamiento post-traducciona

En síntesis no hay diferencias significativas entre los niveles relativos de mRNA de integrina $\alpha 6$ ni de $\beta 4$ entre pacientes y controles. A nivel de proteínas, en ambos grupos de individuos se observan cambios significativos en los niveles relativos, hecho que indicaría cambios en la regulación post-transcripcional.

Para analizar la distribución subcelular de la integrina $\alpha 6\beta 4$, se hizo la detección de la subunidad $\beta 4$, la cual, como ya se mencionó, sólo se puede ubicar en la superficie celular cuando está dimerizada con $\alpha 6$. Además, como ya se comprobó, los péptidos menores, 172 y 145 kDa también se unen a $\alpha 6$. Paralelamente, se analizó su colocalización con laminina.

En controles (Figuras 19 y 20) la integrina $\beta 4$ se encontró en la superficie basal de células mucosas y ductos, y en la superficie basolateral de células serosas, tal como ha sido descrito para glándulas salivales menores [39]. Asimismo, se observan zonas de colocalización con laminina, la cual además se encuentra bien conservada, mostrando una marca bien definida.

En el caso de pacientes, la situación cambia notoriamente (Figura 21). Aún, en individuos con una lámina basal que no se encuentra tan alterada, la distribución basolateral de la integrina ahora no es sólo en acinos serosos, sino también en mucosos. Luego, en otros pacientes, se encontró que a mayor alteración de la lámina basal, la localización de $\beta 4$ fue marcadamente basolateral e incluso se podía encontrar a nivel citoplasmático. Se detectaron zonas con pérdida de colocalización con laminina, y otras donde aún se mantenía. Esta observación demostró una clara redistribución de la integrina $\beta 4$ en pacientes, con un supuesto aumento a medida que crece el grado de desorganización de la estructura acinar.

Interpretamos que esta redistribución sería una forma de aumentar el anclaje celular a medida que la lámina basal se desorganiza, buscando nuevos puntos de unión a laminina, cuya isoforma laminina-5 se encuentra sobreexpresada en pacientes, o bien, para formar uniones en la superficie lateral de la célula acinar con ligandos aún no descritos.

La redistribución de las integrinas durante la migración ha sido demostrada en otros tipos celulares, justamente para buscar nuevos puntos de anclaje, y en muchos casos la unión a un ligando distinto, por ejemplo, en carcinoma, $\alpha6\beta4$ puede mediar la migración celular uniéndose a otros ligandos, como laminina-1, que pasa a ser su ligando de mayor afinidad, aumentando la extensión y la estabilidad de filopodios [48]. Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que en los pacientes con síndrome de Sjögren, laminina-1 muestra una expresión aumentada de manera significativa, por lo tanto podríamos postular una eventual interacción con la integrina $\alpha6\beta4$. Parte del mecanismo de redistribución, sería a través de la internalización de los receptores y posterior redestinación a la superficie celular. Se ha demostrado que el evento de internalización está dirigido por el dominio citoplasmático de $\alpha6$, que contiene señales de internalización [17]. Se ha visto que después de desanclar queratinocitos en cultivo, es posible encontrar $\alpha6\beta4$ junto a otros componentes del hemidesmosoma, en vesículas citoplasmáticas [47]. Esto podría explicar la localización citoplasmática de la integrina $\beta4$ encontrada en los pacientes que mostraban una mayor desorganización de la lámina basal.

Como conclusión del segundo objetivo específico, los pacientes con síndrome de Sjögren, mostraron una redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$, evento que aumenta a medida que crece la desorganización de la lámina basal, perdiéndose la colocalización con laminina.

Finalmente, se hizo una correlación entre los niveles relativos de la integrina $\alpha6$ y $\beta4$, y algunos parámetros morfológicos. Este análisis arrojó resultados acordes a algunas observaciones ya revisadas. Se advierte que existe una fuerte correlación entre la pérdida de organización y la cantidad de integrina $\beta4$ en pacientes. A medida que aumenta el grado de desorganización, aumenta la cantidad de esta integrina, siempre por debajo de los controles, situación que ya había sido observada mediante inmunofluorescencia. Otros resultados mostraron notorias diferencias entre pacientes y controles, haciendo evidente cambios, o desórdenes, en los sistemas de regulación (Tabla 6 y 7).

En el síndrome de Sjögren se produce una desorganización de la lámina basal, que conlleva al desanclaje celular. Los resultados mostraron que en pacientes, la cantidad de integrina $\beta 4$ es menor a controles, y esto se podría deber a mecanismos sobreactivados de regulación mediante proteólisis. Al producirse el desanclaje debido a la desorganización de la lámina basal, se daría inicio a un sistema de respuesta, en el cual los mecanismos de proteólisis serían intervenidos para permitir el aumento de la cantidad de integrina $\beta 4$ disponible, y esta iría en aumento a medida que aumenta la desorganización. Este aumento en los niveles de $\beta 4$, iría en paralelo con la sobreexpresión de laminina-5, para aumentar los puntos de anclaje, permitir la formación del hemidesmosoma y mantener la señalización dependiente de anclaje, las que regulan muchos procesos celulares. Aún cuando este mecanismo de optimización del anclaje bajo un cuadro de desorganización de la lámina basal y desanclaje celular desmesurado, podría ser un sistema eficiente tanto en la función mecánica como en la función señalizadora de la integrina, esta última función podría ser la menos beneficiada. Usando mutantes de $\beta 4$ con delección del “dominio señalizador” que corresponde a las repeticiones FNIII -III y -IV, además del segmento conector, se vio que después de unirse a laminina-5, la integrina $\alpha 6\beta 4$ mantenía la capacidad de unirse a plectina, e incluso a BP180 (esto último sólo *in vivo*), pudiendo formar una estructura tipo hemidesmosoma II, manteniendo intactas las capacidades de anclaje, sin embargo, se imposibilita la unión de BP230, con lo cual se impide la formación del hemidesmosoma tipo I, y por lo tanto gran parte de la señalización dependiente de anclaje [41] (Figura 22).

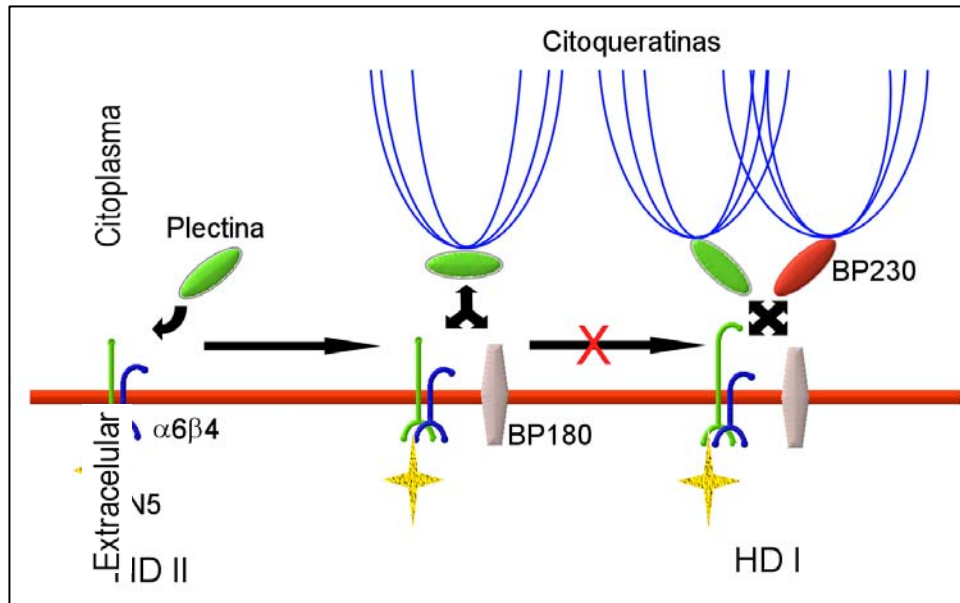


Figura 22. La integrina $\beta4$ con el dominio señalizador truncado, es capaz de unirse a plectina, e incluso a BP180 *in vivo*, pudiendo formar una estructura tipo hemidesmosoma II, manteniendo la capacidad de anclaje sin alteración. Sin embargo no es capaz de unirse a BP230 y formar el complejo hemidesmosoma I [41]. HD I : Hemidesmosoma tipo I, HD II: Hemidesmosoma tipo II. Imagen adaptada de Koster y cols, 2003 [30].

Esta misma situación podría estar sucediendo en los pacientes con síndrome de Sjögren, donde debido a la actividad de calpaína, el péptido de mayor tamaño (172 kDa), dado que sólo carece de los dominios FNIII 3 y 4 (Figura 4), podría mantener su capacidad de anclaje, pero no la de señalización (Figura 23, paso 10). Si a esto se agrega el hecho de que no toda la integrina $\beta4$ intacta, pueda estar óptimamente unida al ligando específico, resultaría en que efectivamente se estaría salvando el anclaje, pero la señalización podría estar disminuida. Entre algunas de las funciones reguladas por estas señales, está la resistencia a apoptosis, además de la mantención de la polaridad celular, que en los pacientes, está seriamente afectada. En este proceso para mantener, o recuperar el anclaje, la integrina $\beta4$ se redistribuye, evento que se observó claramente mediante inmunofluorescencia. La integrina pasó desde una distribución basal en acinos mucosos y basolateral en acinos serosos (cuya diferencia en la distribución, y su relación con la función de estos dos tipos celulares se desconoce), a una distribución basolateral en ambos casos. En la superficie lateral, la integrina $\alpha6\beta4$ podría unirse a otro ligando, y mediante otras señales desconocidas,

formar estructuras capaces de mantener el anclaje (Figura 23, paso 11). No obstante, para esta redistribución y remodelamiento de las interacciones celulares, sería necesario el procesamiento de $\beta 4$ por calpaína (Figura 23, paso 8). Por lo tanto, habría un conflicto para ejecutar la redistribución y mantener la función de señalización propia de una célula que debe estar anclada.

En pacientes con síndrome de Sjögren, ciertas citoquinas están desreguladas en sus niveles de expresión. De la misma manera, también hay factores de crecimiento que se han encontrado aumentados en las glándulas salivales labiales de estos pacientes. Estos factores de crecimiento pueden activar a calpaína [23]. Además, se sabe que factores de crecimiento activan a la Rho GTPasa Rac1, que promueve la migración celular. Cuando se activa esta enzima Rac1, su contraparte RhoA, una proteína de acción inversa (que promueve la adhesión celular), debe ser inhibida, y esto se lleva a cabo por medio de la activación de calpaína que es capaz de procesar a esta proteína [31]. Rac1 induce la migración celular, que implica que la célula se desancla. Esto involucra la pérdida de señales dependientes de anclaje, lo que puede desencadenar anoikis, que es la muerte celular por desanclaje. Por esto, Rac1 es capaz de proteger a las células de este tipo de muerte celular [9].

Factores de crecimiento \rightarrow \uparrow Rac1 \rightarrow \uparrow Calpaína \rightarrow \downarrow RhoA \rightarrow \uparrow Protección a Anoikis

En los pacientes con síndrome de Sjögren, factores de crecimiento podrían estar aumentando la actividad de Rac1 y calpaína (Figura 23, pasos 6 y 7), lo que se traduce en mayor facilidad para la redistribución de la integrina, y recuperación del anclaje (Figura 23, pasos 9 a 11). Debido a la proteólisis del “dominio señalizador” de $\beta 4$ por calpaína, la célula estaría perdiendo señalización por anclaje (si además consideramos que muchas unidades $\beta 4$ intactas no han podido unirse a laminina-5 en una lámina basal desorganizada (Figura 23, paso 5)), lo que podría llevarla a anoikis, pero Rac1 estaría protegiendo de esta muerte (Figura 23, paso 7). Otros eventos, como la mantención de la polaridad celular, estarían completamente desregulados.

Los resultados demuestran que en acinos de glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren, existe un sistema para contrarrestar el daño provocado por la desorganización de la lámina basal. Mientras la destrucción de la matriz podría producir desanclaje celular, pérdida de las señales dependientes de la interacción célula-matriz, y muerte celular, un amplio sistema de redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$, junto con la mantención de las señales antiapoptóticas por medio de factores de crecimiento, son capaces de mantener la sobrevivencia de la célula. Aún así, hay señales que seguramente desaparecen o disminuyen de manera considerable, como aquellas que mantienen la polaridad celular, y posiblemente otras que regulan otros eventos celulares, y que se desconocen, como las que regulan la producción de las secreciones. Sería importante encontrar una forma de mantener la señalización dependiente de anclaje, tal vez activando los dímeros de integrina $\alpha6\beta4$, cuya subunidad $\beta4$ esté intacta y que no esté unida a laminina-5, como en los sitios que se ve pérdida de colocalización mediante inmunofluorescencia. El uso local y dirigido de anticuerpos contra $\beta4$, con función agonista, podría ser una opción para recuperar la señalización.

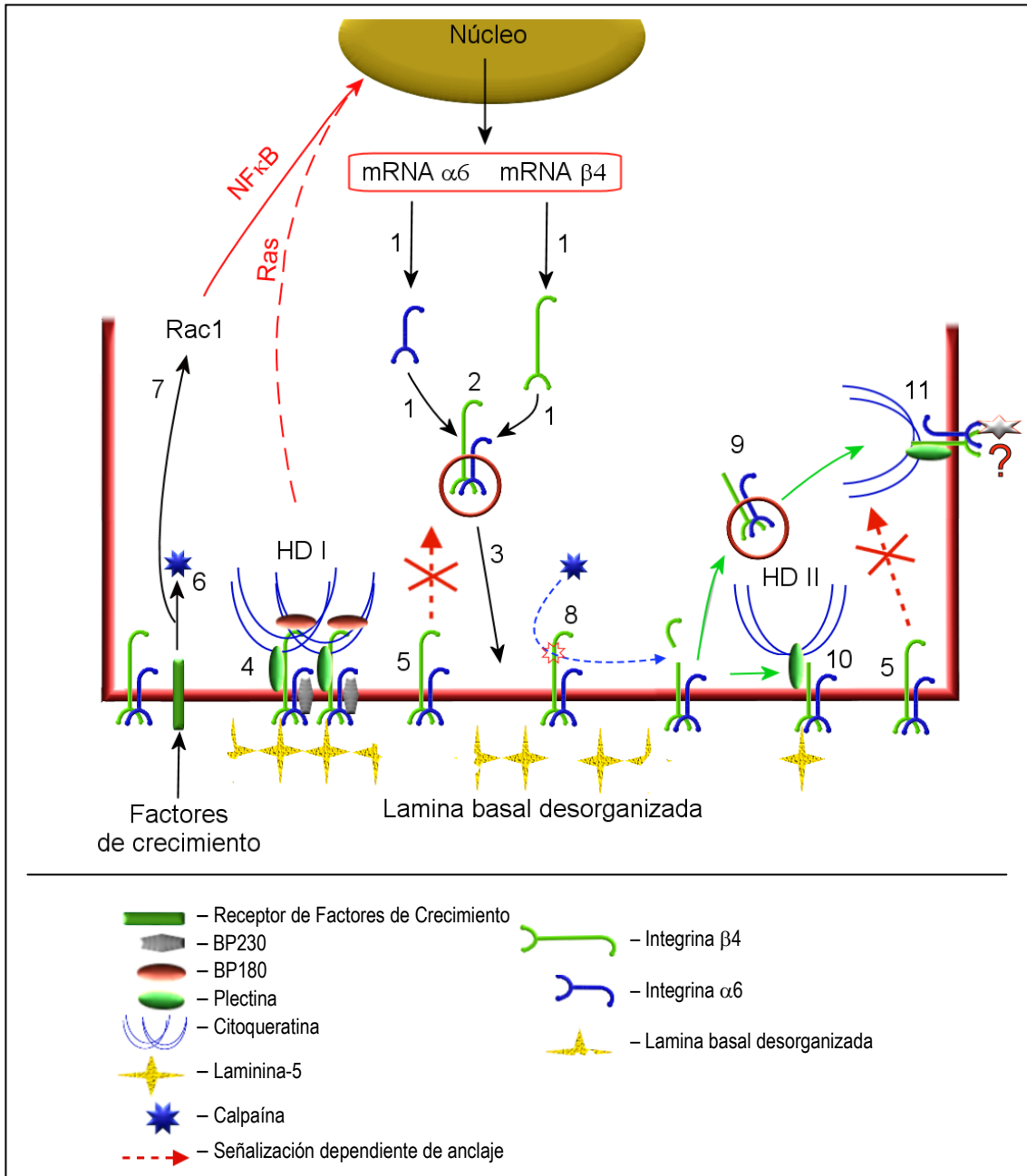


Figura 23. Modelo propuesto como sistema de rescate a anoikis en células acinares de GSLs de pacientes con SS 1. Posibles puntos de regulación post-transcripcional distinta (en forma o actividad) a controles. 2. Formación del dímero $\alpha 6 \beta 4$. 3. Destinación a superficie celular. 4. Contacto con LM5 y formación del hemidesmosoma I. Mantenimiento de anclaje y señales dependientes de éste. 5. Integrina $\beta 4$ intacta, pero sin contacto con LB debido a la desorganización de ésta. No hay ni anclaje ni señalización. 6. Activación de calpaína por factores de crecimiento. 7. Activación de Rac1 que mantiene señales antiapoptóticas. 8. Proteólisis de $\beta 4$ por calpaína. Aumenta el proceso de redistribución. 9. Redistribución de la integrina mediante internalización. 10. Integrina redistribuida. Formación de estructura tipo hemidesmosoma II, capaz de mantener anclaje, pero no señalización. 11. Integrina en zona lateral, posiblemente ligada a ligando desconocido, manteniendo anclaje.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

- Los niveles relativos de mRNA, tanto para la integrina $\alpha6$ como $\beta4$, no presentaron diferencias significativas entre pacientes y controles.
- Los niveles relativos de proteína de integrina $\alpha6$ no presentaron diferencias significativas entre pacientes y controles. Sin embargo, en el grupo de pacientes se detectaron dos subgrupos, uno que se comportaba de manera similar a controles, y otro con una expresión bastante aumentada. El análisis estadístico de ambos grupos por separado, mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con expresión alta y el grupo control. Para determinar si esta cantidad mayor de integrina $\alpha6$ podría atribuirse al infiltrado linfocitario, se evaluó los niveles relativos de integrina $\beta1$, pero estos resultados no mostraron relación con los niveles de $\alpha6$, por lo tanto se descartó esta posibilidad. Las diferencias podrían deberse a mecanismos de regulación post-transcripcional.
- Los niveles relativos de proteína de integrina $\beta4$ mostraron una diferencia significativa entre controles y pacientes, con niveles relativos menores en pacientes. También se encontraron péptidos de menor masa molecular correspondientes a productos de proteólisis de $\beta4$ por calpaína. Al analizar la razón de proteólisis entre pacientes y controles, se encontró que esta era mayor en pacientes, aunque la diferencia no fue significativa.
- Tanto la integrina $\beta4$ intacta, como sus dos productos de proteólisis de 172 y 145 kDa, se unen a la integrina $\alpha6$.
- La distribución subcelular de la integrina $\alpha6\beta4$. mostró una marcada redistribución en pacientes, encontrándose en la superficie basolateral, e incluso a nivel citoplasmático. Este fenómeno fue dependiente del grado de desorganización de la lámina basal. A mayor desorganización, mayor redistribución, hecho que fue evaluado estadísticamente mediante estudios de correlación.

En conclusión, estos resultados confirmaron la hipótesis de manera parcial. Existiría un mecanismo de rescate de la célula acinar para evitar la muerte celular por desanclaje, en el que sería muy importante el papel de la redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$, acompañada de una sobreexpresión de su ligando laminina-5, con lo cual se buscaría aumentar los puntos de anclaje. No se encontró sobreexpresión de ninguna de las proteínas a nivel de mRNA. Al analizar los niveles relativos de expresión, se encontraron aumentos y disminuciones, cambios que sólo exponen los posibles desniveles en el control post-traducciona l de la proteína. Por lo tanto, para mantener el anclaje, sólo sería necesario la redistribución de la integrina $\alpha6\beta4$. Eventos como la mantención de la señalización por anclaje, serían mantenidos probablemente por otros mecanismos.

REFERENCIAS

1. Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell*, 4rd edn. Garland, New York ; London
2. Anaya J.M. RM, García M. (2001) *Síndrome de Sjögren*, 1th edn. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín
3. Aumailley M, El Khal A, Knoss N, Tunggal L (2003) Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol* 22: 49-54
4. Azuma M, Motegi K, Aota K, Hayashi Y, Sato M (1997) Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjogren's syndrome salivary glands. *Lab Invest* 77: 269-80
5. Belkin AM, Stepp MA (2000) Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51: 280-301
6. Borradori L, Koch PJ, Niessen CM, Erkeland S, van Leusden MR, Sonnenberg A (1997) The localization of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmic domain and seems to be regulated by the beta4 integrin subunit. *J Cell Biol* 136: 1333-47
7. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
8. Chopra A, Maitra B, Korman NJ (1998) Decreased mRNA expression of several basement membrane components in basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 110: 52-6
9. Coniglio SJ, Jou TS, Symons M (2001) Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem* 276: 28113-20
10. Dans M, Gagnoux-Palacios L, Blaikie P, Klein S, Mariotti A, Giancotti FG (2001) Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J Biol Chem* 276: 1494-502
11. Davis TL, Rabinovitz I, Futscher BW, Schnolzer M, Burger F, Liu Y, Kulesz-Martin M, Cress AE (2001) Identification of a novel structural variant of the alpha 6 integrin. *J Biol Chem* 276: 26099-106
12. Delwel GO, Kuikman I, van der Schors RC, de Melker AA, Sonnenberg A (1997) Identification of the cleavage sites in the alpha6A integrin subunit: structural requirements for cleavage and functional analysis of the uncleaved alpha6Abeta1 integrin. *Biochem J* 324 (Pt 1): 263-72
13. Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Larsson E, Ekblom M, Vestweber D, Ekblom P (1996) Integrin alpha 6B beta 1 is involved in kidney tubulogenesis in vitro. *J Cell Sci* 109 (Pt 12): 2801-10
14. Fox PC, Brennan M, Di Sun P (1999) Cytokine expression in human labial minor salivary gland epithelial cells in health and disease. *Arch Oral Biol* 44 Suppl 1: S49-52
15. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E (1994) Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol* 152: 5532-9
16. Frisch SM, Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9: 701-6
17. Gaietta G, Redelmeier TE, Jackson MR, Tamura RN, Quaranta V (1994) Quantitative measurement of alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrin

- internalization under cross-linking conditions: a possible role for alpha 6 cytoplasmic domains. *J Cell Sci* 107 (Pt 12): 3339-49
18. Giancotti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E, Ruoslahti E (1992) Proteolytic processing of endogenous and recombinant beta 4 integrin subunit. *J Cell Biol* 118: 951-9
 19. Giancotti FG (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9: 691-700
 20. Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-32
 21. Giancotti FG (2003) A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4: 149-51
 22. Giancotti FG, Tarone G (2003) Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 173-206
 23. Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A (2004) Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24: 2499-512
 24. Goicovich E, Molina C, Perez P, Aguilera S, Fernandez J, Olea N, Alliende C, Leyton C, Romo R, Leyton L, Gonzalez MJ (2003) Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 48: 2573-84
 25. Hogervorst F, Admiraal LG, Niessen C, Kuikman I, Janssen H, Daams H, Sonnenberg A (1993) Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit. *J Cell Biol* 121: 179-91
 26. Hopkinson SB, Findlay K, deHart GW, Jones JC (1998) Interaction of BP180 (type XVII collagen) and alpha6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol* 111: 1015-22
 27. Humphreys-Beher MG, Peck AB (1999) New concepts for the development of autoimmune exocrinopathy derived from studies with the NOD mouse model. *Arch Oral Biol* 44 Suppl 1: S21-5
 28. Humphreys-Beher MG, Peck AB, Dang H, Talal N (1999) The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 116: 383-7
 29. Inomata M, Hayashi M, Ohno-Iwashita Y, Tsubuki S, Saido TC, Kawashima S (1996) Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 328: 129-34
 30. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A (2003) Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* 116: 387-99
 31. Kulkarni S, Goll DE, Fox JE (2002) Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *J Biol Chem* 277: 24435-41
 32. Kwon Y-J (2004) Remodelación de laminas basales de acinos y ductos de glándulas labiales de pacientes con síndrome de Sjögren. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, Santiago - Chile, pp 60
 33. Lee EC, Lotz MM, Steele GD, Jr., Mercurio AM (1992) The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J Cell Biol* 117: 671-8

34. Mainiero F, Pepe A, Yeon M, Ren Y, Giancotti FG (1996) The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol* 134: 241-53
35. Mainiero F, Murgia C, Wary KK, Curatola AM, Pepe A, Blumberg M, Westwick JK, Der CJ, Giancotti FG (1997) The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *Embo J* 16: 2365-75
36. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
37. Mariotti A, Kedeshian PA, Dans M, Curatola AM, Gagnoux-Palacios L, Giancotti FG (2001) EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* 155: 447-58
38. Mercurio AM (1995) Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol* 5: 419-23
39. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, De Martino C (1992) Localization of the alpha 6 and beta 4 integrin subunits in normal human non-lymphoid tissues. *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 1243-7
40. Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, de Melker AA, Delwel GO, Hulsman EH, Kuikman I, Sonnenberg A (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res* 211: 360-7
41. Nikolopoulos SN, Blaikie P, Yoshioka T, Guo W, Puri C, Tacchetti C, Giancotti FG (2005) Targeted deletion of the integrin beta4 signaling domain suppresses laminin-5-dependent nuclear entry of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB, causing defects in epidermal growth and migration. *Mol Cell Biol* 25: 6090-102
42. Patel YI, McHugh NJ (2000) Apoptosis-new clues to the pathogenesis of Sjogren's syndrome? *Rheumatology (Oxford)* 39: 119-21
43. Perez P, Kwon YJ, Alliende C, Leyton L, Aguilera S, Molina C, Labra C, Julio M, Leyton C, Gonzalez MJ (2005) Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjogren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum* 52: 2751-60
44. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martinez B, Gonzalez MJ (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 43: 2807-17
45. Pérez P, Urzúa, U., Munroe, D., Molina, C., Alliende, C., Olea, N., Aguilera, S., Gonzalez, M.J. (2003) Perfil transcripcional del epitelio de glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjogren determinado por microarreglos de cDNA. XVII Reunión Annual. Sociedad de Biología Celular de Chile. In: Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón - Chile, pp R-70
46. Potts AJ, Croall DE, Hemler ME (1994) Proteolytic cleavage of the integrin beta 4 subunit. *Exp Cell Res* 212: 2-9
47. Poumay Y, Leclercq-Smekens M, Grailly S, Degen A, Leloup R (1993) Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin alpha 6 beta 4 in disperse-detached cultured human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 60: 12-20

48. Rabinovitz I, Mercurio AM (1997) The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol* 139: 1873-84
49. Rabinovitz I, Tsomo L, Mercurio AM (2004) Protein kinase C-alpha phosphorylation of specific serines in the connecting segment of the beta 4 integrin regulates the dynamics of type II hemidesmosomes. *Mol Cell Biol* 24: 4351-60
50. Ruzzi L, Gagnoux-Palacios L, Pinola M, Belli S, Meneguzzi G, D'Alessio M, Zambruno G (1997) A homozygous mutation in the integrin alpha6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Clin Invest* 99: 2826-31
51. Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG, Niessen CM, Steenbergen RD, Snijders PJ, Sonnenberg A (1998) Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol* 142: 271-84
52. Smith JW (1997) Allosteric and proteolytic: two novel modes of regulating integrin function. *Matrix Biol* 16: 173-8
53. Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner TA, Giancotti FG (1995) A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha 6 beta 4-mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol* 129: 473-87
54. Stahl S, Weitzman S, Jones JC (1997) The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci* 110 (Pt 1): 55-63
55. Sun D, Emmert-Buck MR, Fox PC (1998) Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity* 28: 125-37
56. Tamura RN, Rozzo C, Starr L, Chambers J, Reichardt LF, Cooper HM, Quaranta V (1990) Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J Cell Biol* 111: 1593-604
57. van Kooyk Y, Figdor CG (2000) Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12: 542-7
58. van Leusden MR, Kuikman I, Sonnenberg A (1997) The unique cytoplasmic domain of the human integrin variant beta4E is produced by partial retention of intronic sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 826-30
59. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH (2002) Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61: 554-8
60. von Bredow DC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE (1997) Cleavage of beta 4 integrin by matrilysin. *Exp Cell Res* 236: 341-5
61. Wei J, Shaw LM, Mercurio AM (1997) Integrin signaling in leukocytes: lessons from the alpha6beta1 integrin. *J Leukoc Biol* 61: 397-407
62. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C, Apinhasmit W, Chen ZJ, Birkedal-Hansen H, Yamada KM, Stetler-Stevenson WG, Baum BJ (1997) Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 171: 117-24

63. Zahir N, Lakins JN, Russell A, Ming W, Chatterjee C, Rozenberg GI, Marinkovich MP, Weaver VM (2003) Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol* 163: 1397-407